



**Catarina Armanda
Martins Silva**

**Otimização de métodos de avaliação da maturação
fenólica em uvas tintas**



**Catarina Armanda
Martins Silva**

**Otimização de métodos de avaliação da maturação
fenólica em uvas tintas**

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia ramo alimentar, realizada sob a orientação científica da Doutora Cláudia Nunes do departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Professor Doutor Manuel António Coimbra, professor associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

o júri

presidente

Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva
investigador Auxiliar da Universidade de Aveiro

Doutora Cláudia Sofia Cordeiro Nunes
bolseira de Pós-Doutoramento da Universidade de Aveiro

Doutor Fernando Hermínio Ferreira Milheiro Nunes
professor Auxiliar da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

agradecimentos

Agradeço à minha orientadora Doutora Cláudia Nunes e ao Professor Doutor Manuel António Coimbra pela disponibilidade, conselhos e conhecimento transmitido ao longo deste ano.

Agradeço à empresa SAI, em particular, ao Mestre Filipe Ribeiro e ao Mestre João Silva, pela oportunidade de estágio e cooperação ao longo de todo o ano.

Ao Nuno, Joaquim e Raqueis pela boa disposição e ajuda constante.

Agradeço aos meus amigos, aos meus pais, à Cláudia, ao Roberto e à Malfadinha, pela paciência que têm para aturar o meu mau feitio.

Agradeço ao João Ratão (come a xixa e deixa o pão) pela ajuda, paciência, companheirismo e por nunca me ter deixado desistir. Obrigado!

Obrigado a todos que direta e indiretamente me acompanharam neste longo percurso.

palavras-chave

Vitis vinifera, composição fenólica, método Glories, método rápido, vinho, cor.

resumo

O grau de maturação da uva é um fator importante e decisivo na vinificação uma vez que condiciona a qualidade do vinho. Por isso, é fundamental avaliar a maturação fenólica da uva, nomeadamente a nível do conteúdo em antocianinas e polifenóis totais, uma vez que estes compostos têm elevada influência na qualidade organolética no futuro vinho, nomeadamente na cor e sabor.

Neste trabalho foram analisadas amostras de uvas tintas de 9 produtores e de diferentes castas, como Syrah, Cabernet Sauvignon, Alicante Bouchet, Merlot, Aragonez, Touriga Nacional, Vinhão, Espadeiro e Castelão. A avaliação da composição fenólica foi feita usando o método de Glories (método convencional) e o Método rápido (MRap). O objetivo do trabalho foi avaliar a eficiência do MRap e otimizar esta metodologia para uma resposta rápida e exata na avaliação da composição fenólica das uvas ao longo da sua maturação.

Os resultados do método de Glories demonstraram que as antocianinas totais e extratáveis aumentaram ao longo do tempo para todas as castas, enquanto a taxa de extratibilidade das antocianinas diminuiu. Os valores obtidos para os parâmetros de antocianinas totais (AntT), antocianinas extratáveis (AntE), índice de compostos fenólicos totais (IPT) e índice de maturação fenólica (IMF), utilizando o MRap, foram comparados com os obtidos no método Glories para as diferentes castas. A comparação entre os valores obtidos pelos dois métodos revelou que, apesar de existir uma correlação para a maioria das castas, os valores absolutos obtidos pelo MRap eram superiores em relação ao método de Glories. Esta variação deveu-se principalmente a uma extração superior no MRap devido à temperatura superior usada durante a análise. Uma metodologia foi otimizada conjugando os princípios dos dois métodos, Glories e MRap. Esta metodologia apresentou r^2 para AntT, AntE e IMF de 0,92, 0,84 e 0,67, respetivamente, enquanto o grau de significância da correlação foi inferior a 0,01 para AntT e AntE e inferior a 0,05 para o IMF, revelando uma boa capacidade para prever todos os parâmetros analisados.

Em suma, o MRap apresenta-se como uma boa alternativa aos métodos convencionais, tendo como vantagem a diminuição do tempo e recursos. A metodologia otimizada obteve resultados promissores, que tem a vantagem acrescida de ser uma alternativa mais económica.

keywords

Vitis vinifera, phenolic composition, Glories, quick method, wine, color.

abstract

The grapes degree of maturation is an important and decisive factor in winemaking since it affects the quality and type of wine. Therefore, it's fundamental to evaluate the phenolic maturation of the red grapes, namely in terms of anthocyanins and total polyphenols, since these compounds are essential for the wine sensory attributes.

Samples of red grapes from 9 different producers were analyzed. These samples were from different grape varieties, namely Syrah, Cabernet Sauvignon, Alicante Bouschet, Merlot, Aragonez, Touriga Nacional, Vinhão, Espadeiro and Castelão. The evaluation of the phenolic composition was done using the methods of Glories (conventional method) and a quick method (faster methodology). The objective of this work was to evaluate the efficiency of the quick method and to optimize this methodology to give a rapid and accurate response in the evaluation of the phenolic composition of the grapes during their maturation.

The results of the Glories method showed that total and extractable anthocyanins increased over time for all grape varieties, while the anthocyanins extractability rate decreased. The values obtained for the total anthocyanins (AntT), extracted anthocyanins (AntE), total phenolic compounds index (IPT), and phenolics maturation index (IMF) parameters using quick method were compared with those obtained by the Glories method for the different grape varieties. The relationship between the values showed that the correlations were good for all analysed parameters, between the different varieties. However, the values obtained with the quick method were much superior in relation to Glories. The higher values are related to the higher extraction rate of compounds due to the higher temperature used during the procedure. A methodology was developed by conjugation of the principles of both methods. This methodology presented a r^2 for AntT, AntE and IMF of 0.92, 0.84 and 0.67, respectively, while the degree of significance of the correlation was less than 0.01 for AntT and AntE and less than 0.05 for IMF, revealing a its capacity to predict all parameters analysed.

In general, quick method is a good alternative to conventional methods, with the advantage of decreasing time and resources. The optimized methodology, which has the added advantage of being a more economical alternative, has showed promising results.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1 - FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	1
1.1. ENQUADRAMENTO GERAL DO TRABALHO	3
1.1.1. APRESENTAÇÃO DA EMPRESA	3
1.2. AS UVAS.....	4
1.2.1. PELÍCULA.....	4
1.2.2. POLPA	5
1.2.3. GRAINHAS	7
1.3. COMPOSTOS FENÓLICOS DAS UVAS E DO VINHO	7
1.3.1. ANTOCIANINAS.....	7
1.3.2. FLAVANÓIS	9
1.3.3. FLAVONÓIS	11
1.3.4. COMPOSTOS DE ORIGEM NÃO FLAVONÓIDE	12
1.4. MATURAÇÃO DA UVA	13
1.4.1. PRODUÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	18
1.4.1.1. <i>Antocianinas</i>	20
1.4.1.2. <i>Taninos condensados</i>	21
1.5. MÉTODOS DE ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	21
1.5.1. METODOLOGIAS DE QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS	22
1.5.1.1. <i>Método alternativo à metodologia convencional</i>	23
1.6. OBJETIVOS DO TRABALHO	25
CAPÍTULO 2 - METODOLOGIA	27
2.1. AMOSTRAGEM	29
2.2. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	29
2.3. MÉTODO DE GLORIES	30
2.4. MÉTODO RÁPIDO (MRAP)	32
2.5. MÉTODO HÍBRIDO	33
2.6. ESPETROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	33

2.7.	DETERMINAÇÃO DA COR DO VINHO	34
2.8.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
	CAPÍTULO 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
3.1.	CARATERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE UVAS	39
3.2.	MÉTODO DE GLORIES	42
3.3.	MÉTODO RÁPIDO	44
3.3.1.	ANTOCIANINAS TOTAIS.....	44
3.3.2.	ANTOCIANINAS EXTRATÁVEIS.....	46
3.3.3.	ÍNDICE DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	47
3.3.4.	ÍNDICE DE MATURAÇÃO FENÓLICA.....	48
3.3.5.	VINHOS.....	50
3.4.	MÉTODO HÍBRIDO	51
3.4.1.	ANTOCIANINAS TOTAIS.....	52
3.4.2.	ANTOCIANINAS EXTRATÁVEIS.....	53
3.4.3.	ÍNDICE DE MATURAÇÃO FENÓLICA.....	54
3.5.	COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS GLORIES, RÁPIDO E HÍBRIDO.....	55
	CAPÍTULO 4 - CONCLUSÕES	57
	CAPÍTULO 5 - PERSPETIVAS FUTURAS	61
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – A relação entre os valores do IMF e o grau de maturação da uva (Bioenos, 2013)	24
Tabela 2 - Parâmetros físico-químicos do mosto das diferentes amostras ao longo da maturação (inicial e final).....	39
Tabela 3 – Evolução com a maturação das AntT e EA das diferentes castas.	44
Tabela 4 - Parâmetros físico-químicos dos diferentes vinhos.	50
Tabela 5 -Comparação dos principais resultados obtidos por cada método avaliado neste trabalho.	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Diferentes tecidos presentes no bago de uva (Chervin et al., 2012).....	4
Figura 2 - Estrutura das antocianinas (Kennedy et al., 2006).....	8
Figura 3 – Reações das antocianinas em soluções aquosas e em vinho (R1, R2 = H, OH, OCH3): transferência de próton (a); hidratação (b); branqueamento com sulfito (c) (Cheynier et al., 2006).....	9
Figura 4- Representação das estruturas químicas dos flavan-3-ol presentes nas uvas (Jackson, 2008).....	10
Figura 5 – Representação das estruturas das proantocianidinas (Freitas & Mateus, 2001).	11
Figura 6 - Estruturas químicas dos principais flavonóis (Cheynier et al., 2006).	12
Figura 7 - Fases de crescimento do bago e acumulação de compostos (Correia, 2013).	14
Figura 8 - Vias de biossíntese de compostos fenólicos (Ribereau-Gayon et al., 2006a).....	19
Figura 9 - Evolução dos compostos fenólicos. (resultados expressos em mg/g de peso seco: □, antocianinas na película; ♦, taninos na película; ■, taninos nas grainhas) (Ribereau-Gayon et al., 2006a).	20
Figura 10 - Refratômetro portátil.	29
Figura 11 - Maceração das amostras uvas trituradas a solução (a) pH 1,0 e (b) pH 3,2.	30
Figura 12 – Maceração das uvas trituradas no equipamento MRap.....	32
Figura 13 - Sistema Bacchus.	34
Figura 14 - Evolução da AT e pH do mosto da casta vinhão ao longo do tempo.	41
Figura 15 - Evolução da TAP do mosto da casta vinhão ao longo do tempo.....	41
Figura 16 - Evolução das antocianinas totais e extratáveis de uvas da casta vinhão ao longo do tempo.	42
Figura 17 - Extratibilidade das antocianinas ao longo do tempo.	43
Figura 18 - Comparação entre os valores das AntT, em mg/L, de diferentes castas obtidos pelo método de Glories e pelo MRap. A – Syr; B – CS; C – TN; D – AB; E – OC.	45

Figura 19 - Comparação entre os valores das AntE, em mg/L, de diferentes castas obtidos pelo método de Glories e pelo MRap. A – Syr; B – CS; C – TN; D – AB; E – OC.	46
Figura 20 - Comparação entre os IPT de diferentes castas obtidos pelo método de Glories e pelo MRap. A – Syr; B – CS; C – TN; D – AB; E – OC.	48
Figura 21 - Comparação entre os IMF de diferentes castas obtidos pelo método de Glories e pelo MRap. A – Syr; B – CS; C – TN; D – AB; E – OC.	49
Figura 22 - Comparação da cor do vinho com a cor provável obtida pelo MRap.....	51
Figura 23 - Comparação entre as AntT, em mg/L, obtidas pelo HMS e pelo MRap.	52
Figura 24 - Comparação entre as AntE, em mg/L, obtidas pelo MRap e a razão entre AntT, em mg/L, e IMF do HMS.	54
Figura 25 - Comparação entre os IMF obtidos pelo HMS e pelo MRap.	55

LISTA DE ABREVIATURAS

A280 – Absorvância a 280 nm
A520 – Absorvância a 520 nm
AB – Alicant Bouschet
AL -Ácido láctico
AM – Ácido málico
AntE – Antocianinas extratáveis
AntT – Antocianinas totais
AR - Açúcares redutores
AT – Acidez titulável
AV – Acidez volátil
Az – Aragonez
B - Bairrada
Bg- Baga
C – Castelão
C₄ – Carbone 4
C₆ – Carbone 6
C₈ – Carbone 8
CS – Cabernet Sauvignon
D – Douro
Da – Dão
EA – Extratabilidade das antocianinas
Esp – Espadeiro

EtOH – Etanol
Fd – Fator de diluição
FTIR - Espectroscopia de infra-vermelho com transformada de Fourier
HMS – Método Híbrido
IC – Intensidade da cor
IMF – Índice de maturação fenólica
IPT – Índice de polifenóis totais
L - Lisboa
M – Merlot
MP – Taninos provenientes das grainhas
MRap – Método Rápido
MV – Massa volúmica
OC – Outras castas
RVV – Região demarcada dos vinhos verdes
SAI – Segurança Alimentar Integrada
Syr - Syrah
T – Tejo
TAP – Teor alcoólico provável
TN – Touriga Nacional
TF – Touriga Franca
V – Vinhão

CAPÍTULO 1 - FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.1. ENQUADRAMENTO GERAL DO TRABALHO

A produção mundial de vinho rondou os 307 milhões de hL no ano de 2014, sendo que Portugal foi responsável pela produção de 6 milhões de hL, dos quais 48% foram destinados à exportação. Estes dados colocam Portugal no 5º lugar de países produtores de vinho a nível europeu, depois da Itália, França, Espanha e Alemanha, e em 11º lugar a nível mundial (FAO, 2016; IVV, 2016). Relativamente ao consumo *per capita* de vinho, no período entre 2000 e 2012, Portugal aumentou de 53,2 para 55,4 L, contrastando com a tendência decrescente europeia (OIV, 2012). O elevado volume de exportações de vinho em Portugal é acompanhado por um aumento da rentabilidade económica, na medida que o valor por litro de vinho exportado aumentou cerca de 26% nos últimos três anos (INE, 2016). Estes dados estatísticos justificam a necessidade crescente de garantir a qualidade do vinho. Desta forma, empresas de produtos enológicos e de análises de uvas e vinho surgem como uma fonte de conhecimento especializado, ajudando os produtores a obter vinhos equilibrados ao nível organolético. Assim, o contributo destas empresas tem tornado o mercado nacional cada vez mais competitivo e com mais ferramentas para explorar novos mercados.

1.1.1. Apresentação da empresa

A SAI, Segurança Alimentar Integrada, foi fundada em 2007, em Paredes, tendo como objetivo o apoio à implementação de novas práticas enológicas, assim como a comercialização, investigação e produção de novos produtos e tendências no sector.

No início, a empresa era apenas uma loja com 40m², mas a veia empreendedora dos seus fundadores levou ao seu crescimento, contando hoje com umas instalações de 500m² e um laboratório totalmente equipado e vocacionado para o seu ramo de atividade.

A SAI é uma empresa multifacetada, abrangendo áreas do conhecimento como a enologia e viticultura, biotecnologia, química, microbiologia, controlo de qualidade, gestão da qualidade e segurança alimentar, estando apta a ser um interlocutor de confiança, onde os seus êxitos se reveem nos êxitos dos seus clientes. A sua atividade vai desde da comercialização de produtos enológicos e produtos de higiene para adegas, até à análise laboratorial dos vinhos, onde são efetuados variados controlos e ensaios de afinação, testes de estabilização, controlo microbiológico e também análise de águas. Além disso, realiza controlo de maturação da uva e análises do mosto. Apesar da atividade

principal ser comercial, a SAI não se limita a vender produtos, prestando aconselhamento e suporte técnico. Em suma, a SAI tem capacidade de produção interna, tem controle laboratorial e trabalha com a sua marca, destacando-se a nível nacional.

1.2. AS UVAS

As uvas são o fruto da videira, que pertence à família das Vitaceae, sendo a espécie *Vitis vinífera* a mais usada na vinificação. Este fruto pertence ao grupo dos frutos não-climatéricos, uma vez que apresenta uma baixa atividade fisiológica pós-colheita. Por este motivo, deve ser colhido assim que atinge níveis ótimos de desenvolvimento, principalmente ao nível da cor e do conteúdo em ácidos e açúcares livres (Castellarin *et al.*, 2011).

O bago de uva é constituído por um conjunto de tecidos, designados por pericarpo, que envolvem as sementes/grainhas e representam 93 a 97 % do peso do cacho. O pericarpo divide-se em 3 partes (Figura 1): (i) exocarpo, a película ou pele; (ii) mesocarpo, a polpa; e (iii) endocarpo, tecido que contém as grainhas, mas que não se distingue do resto da polpa (Jackson, 2008).

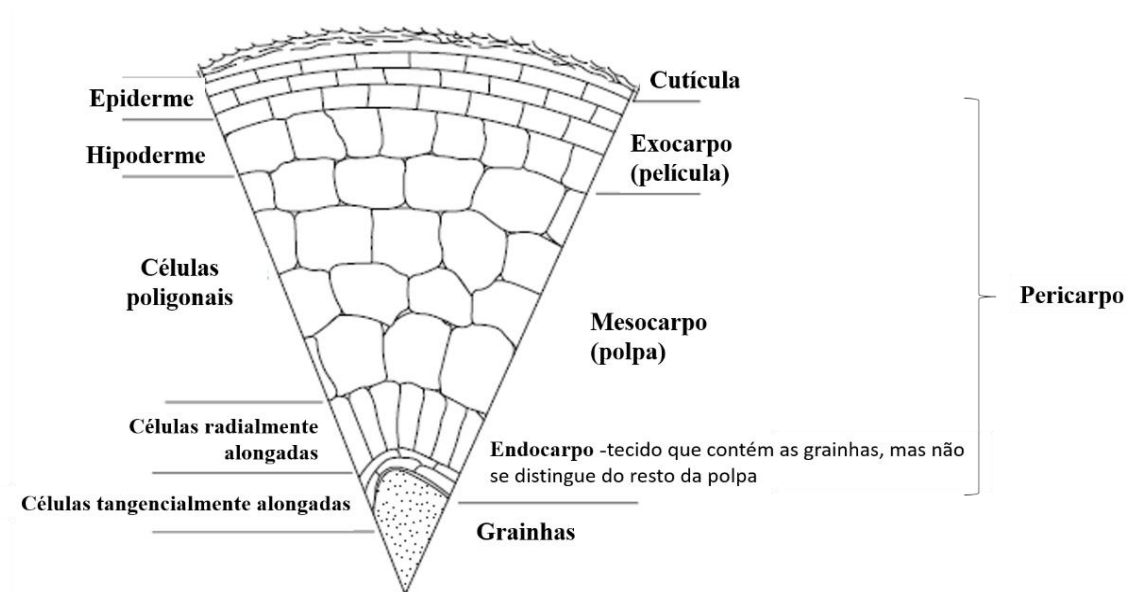


Figura 1 - Diferentes tecidos presentes no bago de uva (Chervin *et al.*, 2012).

1.2.1. Película

A película é uma membrana heterogênea e, dependendo do tipo de uva, representa 8 a 20% do peso do bago. Esta membrana distende-se à medida que o bago cresce e divide-se em: epiderme e hipoderme (Chervin *et al.*, 2012).

A epiderme é estruturada por uma ou duas camadas de células, tangencialmente alongadas, cuja espessura depende da variedade de uva. Esta é revestida por uma camada com cerca de 3 μm de espessura, designada de cutícula, que é constituída por ácidos gordos (cutina) e coberta por uma substância cerosa, responsável pela impermeabilidade e resistência do bago contra infeções e lesões mecânicas (Chervin *et al.*, 2012). Por outro lado, a hipoderme é formada por duas regiões distintas: uma região externa composta por células retangulares e uma região interna composta por células poligonais (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006a).

A película é pobre em açúcares e rica em ácidos, sendo o ácido cítrico predominante. No entanto, em uvas verdes existem quantidades consideráveis de ácido málico e ácido tartárico, sendo que, durante a maturação, o primeiro é metabolizado e o segundo é esterificado com ácidos fenólicos como, os ácidos cafeico e cumárico (Lamikanra *et al.*, 1995; Mazza *et al.*, 1999; Topalovic & Mikulic-Petkovsek, 2010). Além disso, ocorre a acumulação de metabolitos secundários, nomeadamente ácidos fenólicos, como: (i) os derivados do ácido benzóico e cinâmico, que atingem 8,5-10 $\mu\text{g/g}$ de peso seco (em equivalentes de ácido gálico) e 1,33 $\mu\text{g/g}$ de peso seco (em equivalentes de ácido cafeico), respetivamente; (ii) os flavonóis, 300-600 $\mu\text{g/g}$ de peso seco (em equivalentes de quercetina); (iii) os taninos, com valores entre 60 a 200 $\mu\text{g/g}$ de peso seco (em equivalentes de catequina); e (iv) os compostos de aroma (terpenóis), que atingem 25-167 $\mu\text{g/g}$ de peso (em equivalentes de resveratrol). Em uvas tintas também se verifica a presença de compostos de cor, onde se destacam as antocianinas, cuja concentração atinge 3000-4000 $\mu\text{g/g}$ de peso seco (em equivalentes de malvidina 3-glucosídeo) (Kennedy *et al.*, 2001; Topalovic & Mikulic-Petkovsek, 2010, Zhu *et al.*, 2012).

1.2.2. Polpa

A polpa representa cerca de 75 a 85% do peso do bago e é composta por células largas e poligonais, com paredes celulares muito finas. A rutura destas células, por esmagamento mecânico ou por pressão das uvas, produz o sumo de uva ou mosto. O mosto é um líquido turvo, uma vez que contém em suspensão diversos compostos como: (i) celulose, hemiceluloses e substâncias pécicas das paredes celulares; (ii) proteínas e outros materiais citoplasmáticos; e (iii) restos da película (Peynaud, 1993). Além disso, este líquido apresenta uma cor avermelhada nas uvas tintas e uma elevada densidade, causada pelo seu conteúdo de açúcares que são, essencialmente, glucose e frutose. Outros

açúcares também têm sido identificados como: arabinose, xilose, ramnose, maltose e rafinose, provenientes das hemiceluloses como: xiloglucanas, galactanas, glucomanas e xilanas (Vidal *et al.*, 2003). Atendendo à heterogeneidade do bago de uva, as zonas periféricas e centrais são sempre mais ricas em açúcar do que a zona intermediária da polpa (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006a).

A polpa é rica em ácidos como o ácido pirúvico, α -cetoglutárico, fumárico, tartárico, málico, cítrico e galacturônico, sendo este último, um monossacarídeo que contém um grupo carboxilo e é um dos constituintes dos polissacarídeos pécticos. No entanto, a acidez do mosto deve-se, principalmente, à presença dos ácidos tartárico, málico e cítrico. A acidez total pode variar entre 4,5 a 15 g.L⁻¹ de ácido tartárico, dependendo da forma de cultivo, do clima e da maturação da uva (Topalovic & Mikulic-Petkovsek, 2010).

O conteúdo em cátions presentes na polpa é elevado, sendo o potássio o elemento mais abundante, seguido do cálcio, do magnésio e do sódio. Dos oligoelementos vestigiais, destaca-se a presença de ferro e de chumbo (Rovio *et al.*, 2011).

Os compostos azotados na uva são fundamentais para o desenvolvimento de compostos de aroma e de sabor, que são produzidos principalmente pelas leveduras, durante a fermentação. Desta forma, o teor em azoto é um parâmetro que permite determinar o potencial da colheita, de forma a obter vinhos de qualidade. A polpa da uva contém 20-25% do total de azoto presente no bago, sendo que este é transportado na uva sob a forma de catião de amónio ou aminoácidos livres. O catião amónio é uma fonte de azoto facilmente metabolizável pelas leveduras e a sua concentração varia entre 5-325 mg/L de mosto de uva. Os aminoácidos, na forma livre, constituem uma outra fonte de azoto para as leveduras, sendo que as suas concentrações variam muito consoante a variedade de uva. Os aminoácidos principais são a glutamina (9-4499 mg/L), a prolina (9-2257 mg/L) e a arginina (20-2322 mg/L). As proteínas da uva constituem outra classe de compostos azotados presentes na polpa, onde se destacam as quitinases. Estas, no entanto, não são metabolizadas pelas leveduras durante a fermentação, provocando a turbidez e a precipitação de compostos no vinho, o que condiciona a sua qualidade (Bell & Henschke, 2005).

Na polpa podem ainda ser acumulados outros compostos, como álcoois, aldeídos e ésteres, que contribuem para o aroma da uva (Bell & Henschke, 2005).

1.2.3. Grainhas

As grainhas representam até 6% do peso do bago e são constituídas por 35% de hidratos de carbono, 6% de compostos azotados, 4% de minerais e 15% de lípidos, dos quais predominam o ácido oleico e linoleico. Esta estrutura é muita rica em compostos fenólicos, contendo 20 a 55% do total de polifenóis do bago (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006a).

1.3. COMPOSTOS FENÓLICOS DAS UVAS E DO VINHO

Os compostos fenólicos são uma classe de compostos químicos, formados por um anel aromático hidroxilado, sendo a forma mais simples deste elemento estrutural o fenol (Teixeira *et al.*, 2013). Estes podem ser divididos em dois grupos: os flavonóides e os não flavonóides. O primeiro grupo engloba as antocianinas, os flavanóis e os flavonóis, enquanto o segundo grupo engloba os ácidos benzóicos e cinâmicos (Paixão *et al.*, 2007). Nas uvas, as antocianinas e os flavanóis, particularmente os taninos, são, quantitativamente, os grupos de compostos fenólicos mais importantes para a qualidade do vinho, uma vez que influenciam as suas características sensoriais, nomeadamente a cor, a adstringência e a estrutura (Costa *et al.*, 2015).

1.3.1. Antocianinas

As antocianinas são os principais compostos fenólicos responsáveis pela cor vermelha, roxa ou azul das uvas e, conseqüentemente, pela cor do vinho tinto (Teixeira *et al.*, 2013). Estruturalmente, estes compostos são glucósidos de sais flavílicos (2-fenil-benzopirano) polihidroxilados ou polimetoxilados (Figura 2), que se diferenciam pelo: (i) número de grupos hidroxilo e o seu grau de metilação no anel lateral; (ii) número e natureza dos açúcares ligados à molécula; (iii) número e natureza das cadeias alifáticas ou aromáticas esterificadas com os açúcares (Cabrita *et al.*, 1999).

As principais antocianinas presentes no género *Vitis* são a delfinidina, a cianidina, a petunidina, a peonidina e a malvidina, sendo que esta última encontra-se sempre em quantidades superiores (Cheynier *et al.*, 2006). Na espécie *Vitis vinífera* é comum encontrar-se uma molécula de glucose ligada na posição 3 da antocianina, enquanto outras espécies são diglucosiladas nas posições 3 e 5. Além disso, ácidos como o acético, o cumárico e o cafeico podem esterificar a glucose na posição 6 (Teixeira *et al.*, 2013).

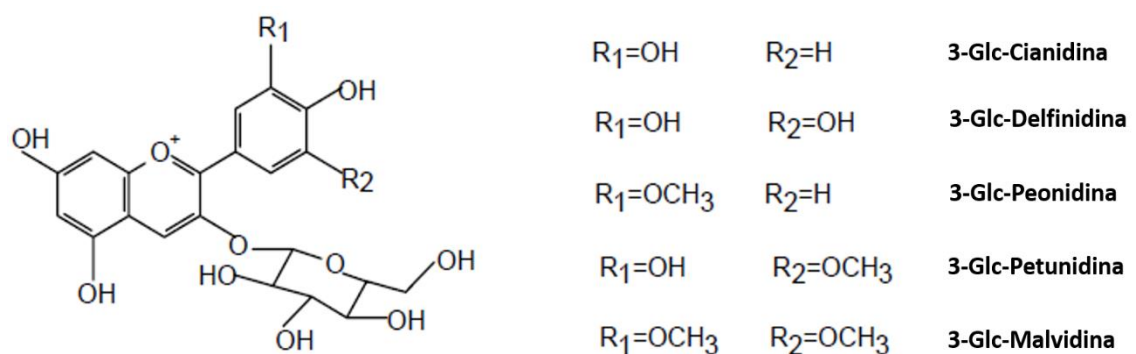


Figura 2 - Estrutura das antocianinas (Kennedy *et al.*, 2006).

A cor das antocianinas varia consoante a estrutura química e as condições físico-químicas do meio, variando entre vermelho, laranja e azul. De um modo geral, considera-se que o aumento dos grupos hidroxilo contribuem para tons azulados enquanto os grupos metoxilo têm o efeito inverso, contribuindo para tons vermelhos (Cheynier *et al.*, 2006).

Em solução aquosa, o catião flavílio transfere protões (Figura 3a) e sofre reações de hidratação (Figura 3b), formando bases quinoidais azuis e hemicetais incolores (ou carbinol), respetivamente. A proporção de cada forma é determinada pelo pH do meio. No caso do vinho, as antocianinas ocorrem principalmente na forma hemicetal e hidratada. Além disso, os iões sulfito existentes no meio reagem com a antocianina que contém o catião flavílio, ocorrendo uma reação de branqueamento (Figura 3c). A cor do vinho é assegurada através dois processos de estabilização: (i) a conversão das antocianinas da uva em outros pigmentos; e (ii) mecanismos de associação a outras moléculas, designados de copigmentação (Cheynier *et al.*, 2006).

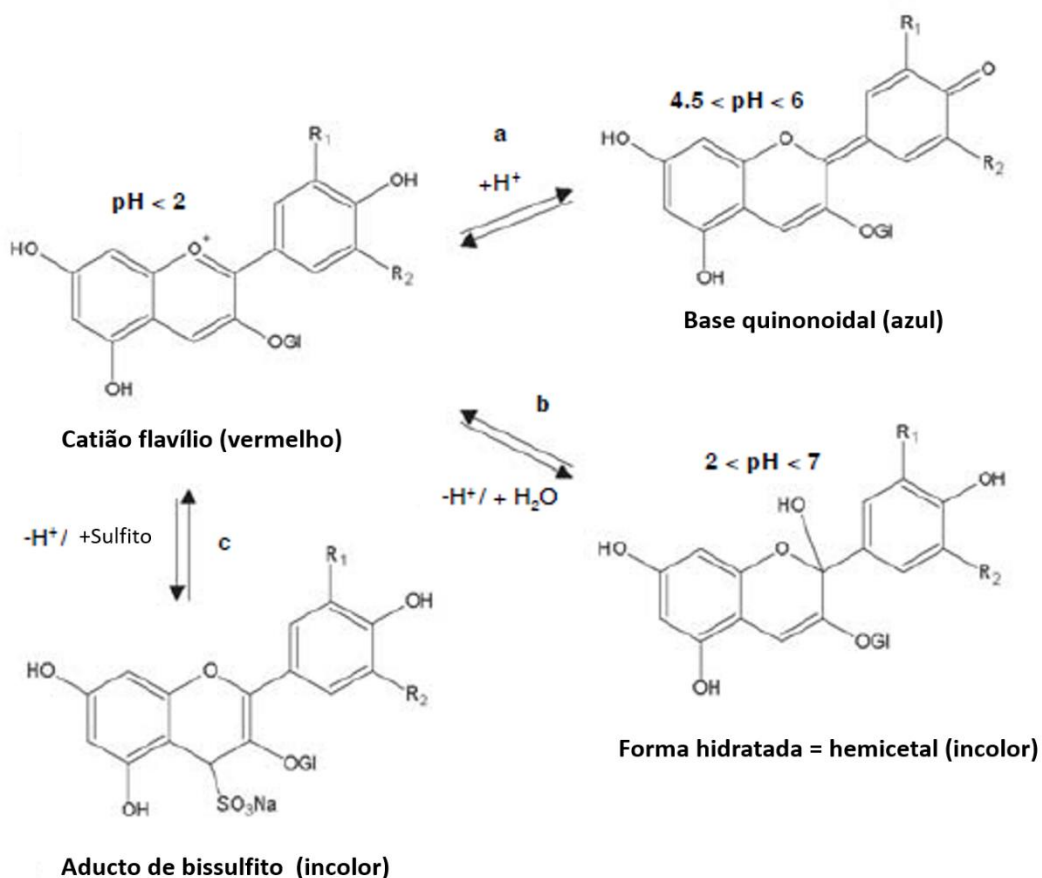


Figura 3 – Reações das antocianinas em soluções aquosas e em vinho ($R_1, R_2 = H, OH, OCH_3$): transferência de próton (a); hidratação (b); branqueamento com sulfito (c) (Cheynier *et al.*, 2006).

1.3.2. Flavanóis

Os flavanóis encontram-se nas uvas e no vinho na forma de monómeros, oligómeros ou polímeros, sendo que os mais importantes são os flavan-3-ol e as proantocianidinas (Teixeira *et al.*, 2013).

Os flavan-3-óis caracterizam-se por possuírem um anel heterocíclico saturado e encontram-se, principalmente, nas grainhas e nas películas das uvas. Nas grainhas, estes compostos são constituídos, essencialmente, por (+) catequinas e o seu isómero (-) epicatequina ligados a epigallocatequina por ligações β (4 \rightarrow 6). Na película encontra-se, principalmente, epigallocatequina e epigallocatequina-3-galato (figura 4) (Garrido & Borges, 2013).

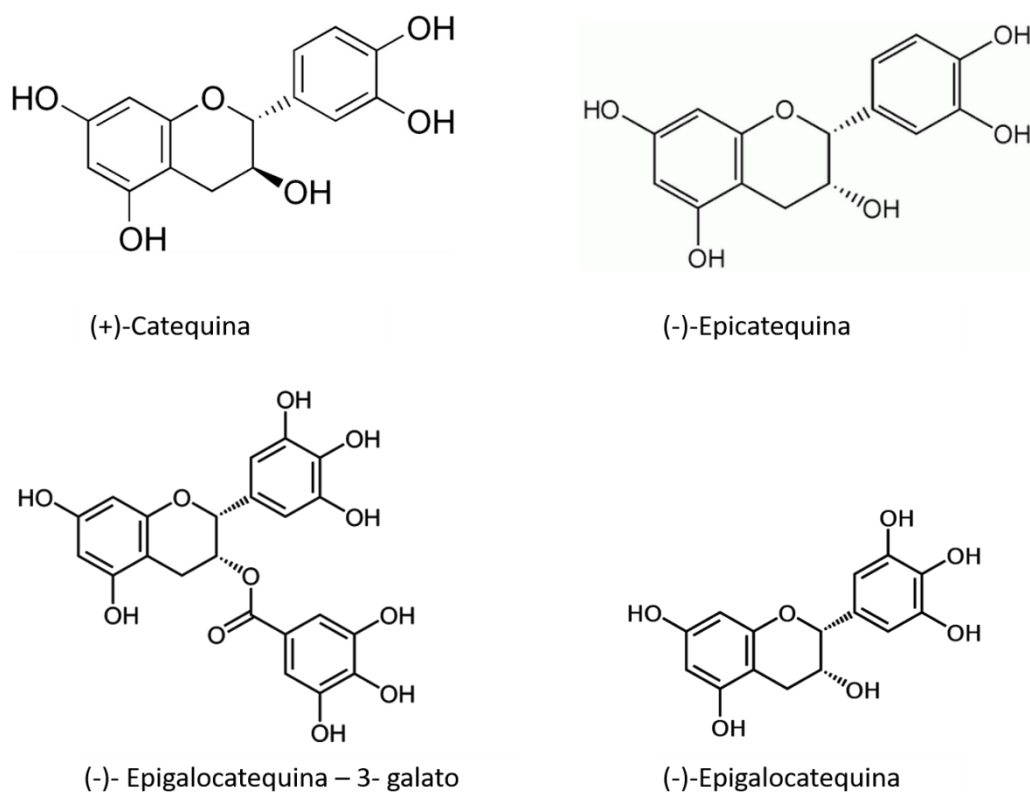


Figura 4- Representação das estruturas químicas dos flavan-3-ol presentes nas uvas (Jackson, 2008).

As proantocianidinas ou taninos condensados são constituídos por oligómeros e polímeros de unidades monoméricas de flavan-3-ol, unidas principalmente por ligações C₄-C₈ e em menor quantidade C₄-C₆ (Figura 5) (Freitas & Mateus, 2001). O termo proantocianidina, deriva do facto de quando estas são aquecidas em meio fortemente ácido e alcoólico, sofrem uma rutura das ligações entre as unidades monoméricas, libertando antocianidinas. Consoante a libertação de cianidina ou delphinidina, estas moléculas recebem o nome de procianidinas ou prodelfinidinas. Nas uvas e no vinho existem sobretudo procianidinas, ou seja oligómeros e polímeros de (+)-catequina e (-)-epicatequina unidas por ligações C₄-C₈ e C₄-C₆ (Freitas & Mateus, 2001).

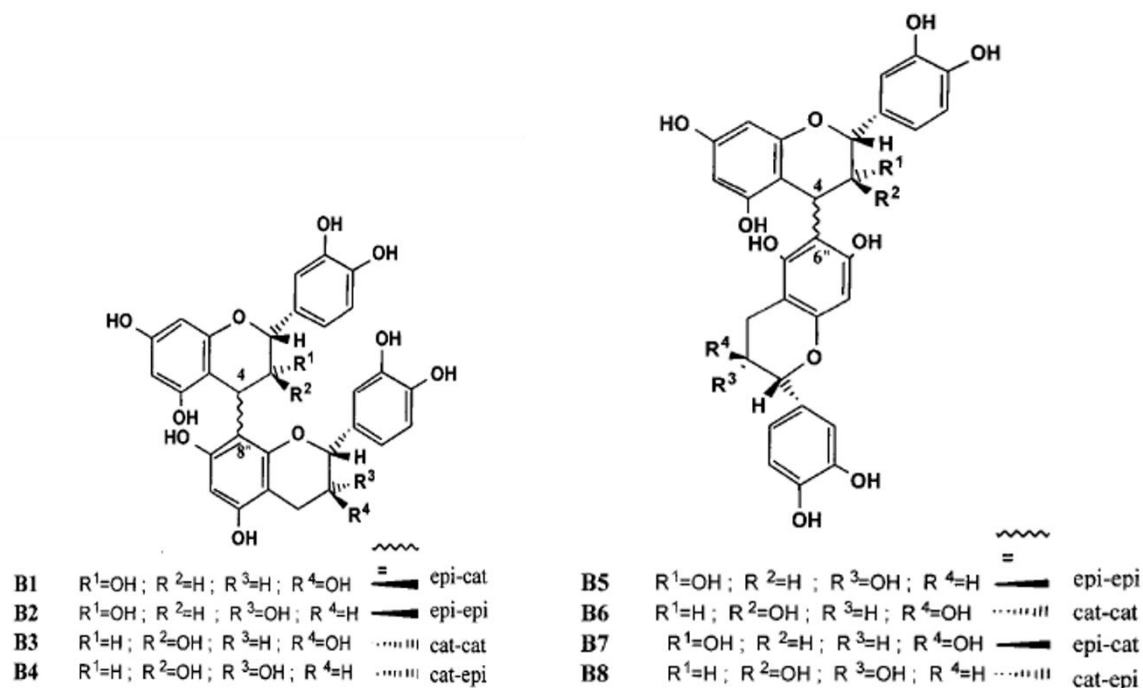


Figura 5 – Representação das estruturas das proantocianidinas (Freitas & Mateus, 2001).

Os taninos condensados têm a capacidade de se combinarem com as proteínas e outros polímeros como os polissacarídeos, provocando a sensação de adstringência, isto é a perda do efeito de lubrificação da saliva por precipitação das proteínas (Freitas & Mateus, 2001).

Durante a conservação e o envelhecimento dos vinhos as modificações no estado de condensação dos taninos influenciam a sua cor em solução e as suas características organoléticas. Os vinhos jovens possuem taninos com uma massa molecular média, que vai aumentando com o envelhecimento dos vinhos (Cheynier *et al.*, 2006).

1.3.3. Flavonóis

Os flavonóis são caracterizados pela presença de uma ligação dupla no anel pirano e um grupo hidroxilo no átomo de carbono 3 (Figura 6). Nas uvas, estes compostos encontram-se glicosilados, normalmente na posição 3. Estas ligações são facilmente hidrolisáveis, sendo que nos vinhos tintos os flavonóis encontram-se normalmente na forma de agliconas. A quercetina, a miricetina e o campferol são os flavonóis presentes nos vinhos em maior quantidade (Garrido & Borges, 2013).

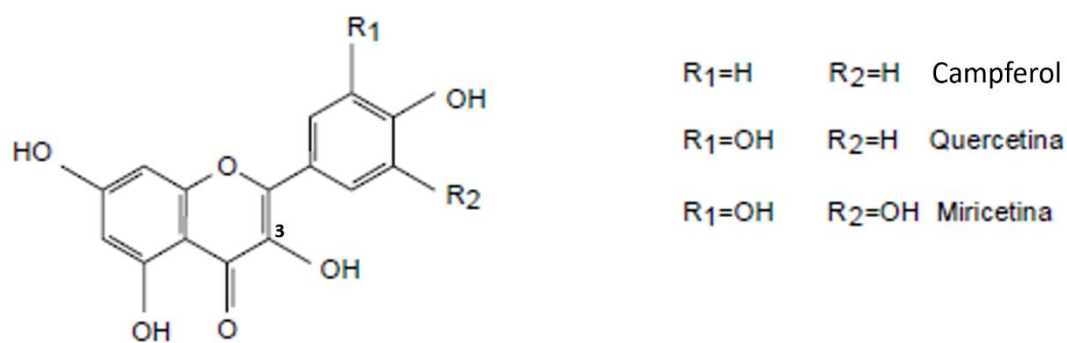


Figura 6 - Estruturas químicas dos principais flavonóis (Cheynier *et al.*, 2006).

A capacidade antioxidante dos flavonóis protege as antocianinas da condensação e de polimerizações oxidativas, permitindo que os vinhos envelhecidos mantenham a coloração vermelha e tonalidades violetas, características dos vinhos mais jovens. Desta forma, os flavonóis apresentam um papel importante na evolução da cor dos vinhos, uma vez que participam em processos de copigmentação com as antocianinas (Gutiérrez *et al.*, 2005).

1.3.4. Compostos de origem não flavonóide

Os compostos não flavonóides compreendem os ácidos fenólicos, nomeadamente ácidos benzóicos e cinâmicos, que representam a terceira classe de compostos fenólicos mais abundantes nas uvas, depois dos taninos e das antocianinas (Kennedy *et al.*, 2006; Tian *et al.*, 2009).

Nas uvas, os ácidos fenólicos maioritários são os ácidos hidroxicinâmicos que se encontram nos vacúolos das células da película e polpa, sob a forma de ésteres tartáricos. Estes compostos têm um papel importante nas oxidações que conduzem ao acastanhamento dos mostos e dos vinhos, uma vez que os seus grupos hidroxilo são dos mais suscetíveis à ação das enzimas fenoloxidásicas. Desta reação resultam as respetivas quinonas que podem reagir com outras moléculas presentes nos mostos levando ao aparecimento de compostos com colorações que podem variar do amarelo ao castanho. Ainda que não exerçam uma influência direta no sabor dos vinhos, os ácidos hidroxicinâmicos estão relacionados com o aparecimento de fenóis voláteis com consequentes alterações no aroma (Ong & Nagel, 1978).

1.4. MATURAÇÃO DA UVA

O grau de maturação da uva é um fator importante e decisivo na vinificação, uma vez que condiciona a qualidade e o tipo de vinho. Nos vinhos de base espumante e nos vinhos brancos a maturação é mais precoce e procuram-se uvas com maior acidez e aroma varietal, enquanto a produção de vinhos tintos e licorosos, procura-se obter uvas com maior nível de maturação, acidez mais baixa e perfis aromáticos de frutos vermelhos. A maturação é o resultado de todos os fenómenos fisiológicos e bioquímicos que ocorrem na videira e está intrinsecamente relacionada com a variedade, o solo, o clima e as condições ambientais (Coombe & McCarthy, 2000).

O crescimento e o desenvolvimento da uva são o resultado de um longo e complexo ciclo de reprodução, que pode ser dividido em três fases, sendo que por vezes existe uma quarta fase (Figura 7). Estas fases estão divididas consoante o diâmetro, o peso e o volume do bago (Peynaud, 1993):

1ª Fase – corresponde ao *período herbáceo* que vai do momento em que se forma os pequenos bagos até à mudança de cor. Neste período, a clorofila é o pigmento mais abundante e as uvas têm uma atividade metabólica muito elevada, caracterizada por uma grande atividade respiratória e uma rápida acumulação de ácidos.

2ª Fase – apresenta um crescimento muito lento, durante o qual ocorre o *véraison* (pintor). O *véraison* é caracterizado pelo aparecimento de cor nas variedades tintas e por uma película translúcida nas variedades brancas. Nesta fase, o bago dilata, tornando-se elástico, e o teor de açúcar aumenta.

3ª Fase – corresponde à maturação, que tem início no pintor e se prolonga até à maturidade. A intensidade respiratória diminui e a atividade enzimática aumenta. Neste período, a uva acumula açúcares livres, catiões como o potássio, aminoácidos e compostos fenólicos, enquanto a concentração de ácido málico e amónia diminui (Chervin *et al.*, 2012).

4ª Fase – ocorre quando o cacho de uva permanece na videira, sofrendo a sobrematuração. Nesta fase já se ultrapassou a maturação propriamente dita, onde as trocas entre planta e fruto cessam, fazendo com que os frutos vivam das suas reservas, percam água e concentrem o seu sumo (Peynaud, 1993).

Em casos excepcionais de temperatura e humidade, a sobrematuração acompanhada pela ação do fungo *Botrytis cinerea*, conduz a um fenómeno designado de apodrecimento nobre. Este fenómeno resulta em mostos mais concentrados. No entanto, a acidez total aumenta numa proporção menor que os restantes componentes do mosto, devido ao consumo de ácido tartárico pelo fungo. Estes mostos são utilizados para a produção de vinhos licorosos, com propriedades organoléticas específicas, devido à presença de compostos de aroma sintetizados pelo fungo (Lorenzini *et al.*, 2015).

Durante a maturação são muitas as variações que ocorrem na uva, ao nível dos açúcares, minerais, ácidos, compostos de aroma e compostos fenólicos.

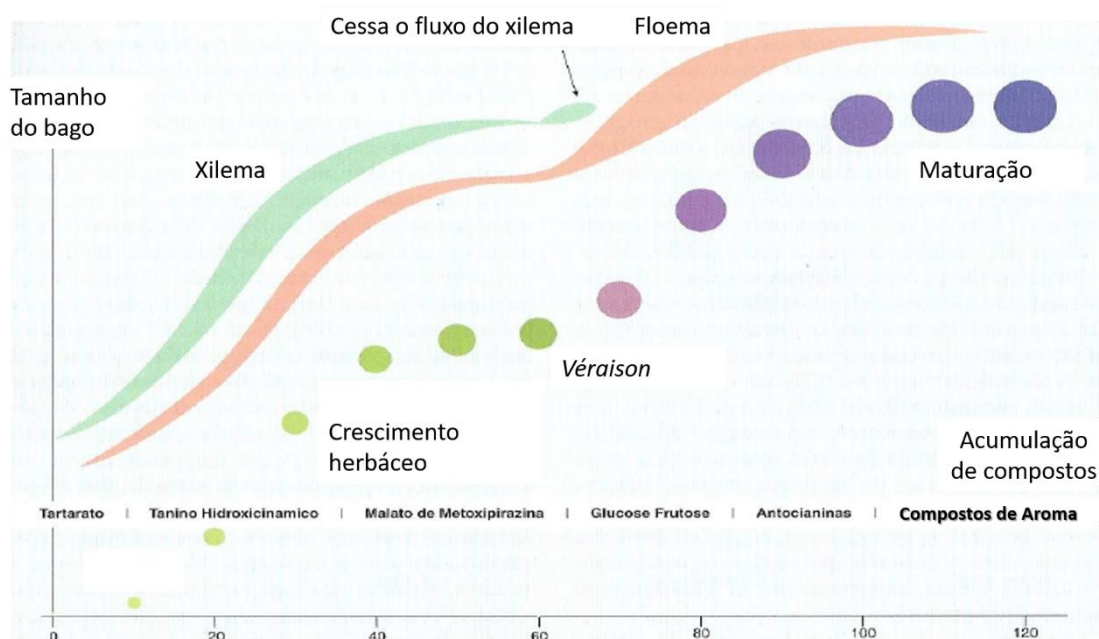


Figura 7 - Fases de crescimento do bago e acumulação de compostos (Correia, 2013).

Açúcares

A quantidade de açúcares acumulados na uva durante a fase de maturação depende da duração da exposição solar em termos intensidade de luz e temperatura. A quantidade de radiação solar recebida durante os meses de agosto e setembro determina o açúcar contido na uva aquando da colheita. Quando mais sol e calor mais açúcar será acumulado no bago da uva. No entanto, o excesso de calor e a seca podem bloquear a fotossíntese, impedindo a evolução normal da maturação (Coombe, 1973).

Os açúcares presentes na uva são ainda os precursores iniciais da biossíntese de compostos fenólicos, nomeadamente as antocianinas. É por este facto que a acumulação

de antocianinas na película da uva se inicia, aproximadamente, uma semana após o início da acumulação de açúcares na película. Resultados experimentais comprovaram ainda que a acumulação de açúcares na película, principalmente frutose, afeta proporcionalmente a acumulação de antocianinas, pois a síntese destes compostos fenólicos está correlacionada com o perfil e concentração dos açúcares presentes na polpa (González-San José & Diez, 1992).

Ácidos

Os ácidos tartárico e málico representam 90% dos ácidos presentes no mosto, sendo que a maior produção ocorre antes do *véraison*. No entanto, a evolução destes dois ácidos, durante o desenvolvimento e maturação da uva, é muito diferente, até porque apresentam vias metabólicas distintas (Liang *et al.*, 2011). O ácido tartárico é um produto secundário do metabolismo dos açúcares, acumulando-se durante a fase de crescimento herbáceo, devido à intensa multiplicação celular. Contudo, durante a maturação, a concentração deste ácido mantém-se relativamente constante, apesar de haver um aumento do volume do bago (DeBolt *et al.*, 2006). O ácido L-(-) málico é um produto intermediário muito ativo no metabolismo da uva e também é formado durante a fase de crescimento herbáceo, contudo a partir do *véraison* a sua concentração diminui (Sweetman *et al.*, 2009).

A transferência de cátions e o consumo de prótons, durante as reações metabólicas, ditam a produção de ácidos a partir de açúcares. Esta regulação iónica ocorre com a ajuda do ácido málico ou tartárico. Consequentemente, a soma destes dois ácidos é relativamente constante. Apesar da sua semelhança química, estes dois ácidos comportam-se de forma muito diferente durante a maturação, sendo que o teor de ácido tartárico das uvas varia muito pouco, enquanto o teor de ácido málico segue a diminuição da acidez total. Existe também uma relação entre a água no solo e a acidez. Em solos húmidos, a maturação é retardada e a uva é mais rica em ácidos. Contudo, quando ocorre um ligeiro stress hídrico a concentração de ácidos diminui e, consequentemente, à subida do pH e à diminuição da acidez (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006a).

Minerais

O transporte e a acumulação de minerais na videira ocorre de forma distinta entre cátions e aniões, por exemplo, no caso do sódio a videira apresenta uma baixa capacidade

de acumulação, conferindo-lhe um certo nível de resistência a solos salgados (Bertoldi *et al.*, 2011).

Em relação à deslocação dos minerais na planta, o potássio é um dos poucos minerais que é transportado pela seiva floémica em simultâneo com os açúcares derivados da fotossíntese. Por isso, à medida que ocorre a acumulação de açúcar na uva, durante a maturação, ocorre um aumento da concentração de potássio (Lang & Thorpe, 1989). Na maioria dos catiões o transporte é feito pela seiva xilémica à medida que a água é exsudada pela uva. No entanto, após o *véraison*, ocorrem alterações na película e a degeneração dos estomas. Estas alterações estão relacionadas com o fim da acumulação de cálcio e magnésio no início da maturação (Lang & Thorpe, 1989).

Outros catiões metálicos, como o zinco, cobre e manganês, são acumulados em quantidades vestigiais, contudo durante a maturação ainda sofrem diminuição. A acumulação de aniões inorgânicos, como sulfatos e fosfatos, acompanha as variações da concentração de catiões (Bertoldi *et al.*, 2011).

Compostos azotados

O transporte de azoto para a uva ocorre, essencialmente, na forma de catiões de amónio ou aminoácidos. Em uvas verdes, o catião amónio representa metade do azoto total. Contudo, a partir do *véraison*, esta concentração diminui enquanto a fração orgânica aumenta, sendo que durante a maturação, os aminoácidos livres atingem 2 a 8 g/L, em equivalentes de leucina (Bell & Henschke, 2005). A arginina é o aminoácido predominante e desempenha um papel importante no metabolismo de azoto, visto que está metabolicamente associado à síntese de outros aminoácidos, como a prolina, a ornitina e o ácido aspártico. Desta forma, a concentração de prolina pode aumentar durante a maturação, devido à transformação da arginina. Além disso, o ácido aspártico constitui uma reserva de ácido oxaloacético que pode ser transformado em ácido málico ou açúcares, durante a maturação (Bell & Henschke, 2005).

A concentração de proteína solúvel atinge o máximo antes da maturidade e depois diminui para o final da maturação, fazendo com que a concentração de proteína do mosto varie entre 1,5 e 100 mg/L. A concentração de proteínas insolúveis de elevado peso molecular, frequentemente ligadas à parede celular, é elevada desde o início do desenvolvimento do bago e continua a aumentar durante a maturação (Bell & Henschke, 2005).

A relação entre compostos azotados e os flavonóides deve-se principalmente à reação de desaminação da tirosina e da fenilalanina, que resultam na formação de ácido cumárico e cinâmico. Estes ácidos fenólicos podem, posteriormente, transformarem-se em calconas e conduzir à formação dos restantes flavonóides, como as antocianinas. A relação entre antocianinas e compostos azotados foi estudada, tendo sido concluído que videiras suplementadas com azoto tiveram um aumento claro nos compostos azotados, contudo, não houve mudanças significativas nos teores de antocianinas. Existe, no entanto, a possibilidade de o aumento de compostos azotados promover a formação de complexos entre proteínas e antocianinas durante a maturação dos vinhos e, consequentemente, alterar a estabilidade da cor do vinho (Bell & Henschke, 2005).

Compostos voláteis

O potencial aromático da uva resulta de uma mistura complexa de diferentes compostos químicos, como os terpenos, os norisoprenóides, os compostos fenólicos voláteis, os ésteres, os aldeídos, os álcoois, os derivados do benzeno, entre outros. Os compostos voláteis podem estar na uva em duas formas: na forma glicosilada e na forma não glicosilada vulgarmente designada por forma livre. Na forma glicosilada, os compostos não contribuem para o aroma, podendo transformar-se em compostos odoríferos por hidrólise da ligação entre a aglicona e o açúcar (Kalua & Boss, 2009).

Os compostos terpénicos são os voláteis mais estudados e, dentro destes, destacam-se os monoterpenóis. Estes, quer na forma livre quer na forma glicosilada, aumentam a sua concentração durante o desenvolvimento do bago da uva (Kalua & Boss, 2009). Por outro lado, os carotenoides, outros compostos precursores de aroma que possuem a mesma origem que os terpenóis, diminuem durante a maturação, enquanto algumas moléculas derivadas dos carotenóides, como os norisoprenóides, aumentam (Styger *et al.*, 2011).

Outros compostos voláteis presentes nas uvas que contribuem para o aroma, são os ésteres, os aldeídos, os álcoois e derivados do benzeno. A influência destes compostos varia ao longo do amadurecimento da uva. Os ésteres, como (z)-3-hexomil-butanoato, estão associados ao início do desenvolvimento da uva. Já os aldeídos, como (E)-2-hexanal e o heptanal, e os álcoois, como hexan-1-ol, estão presentes em todas as etapas do amadurecimento enquanto os derivados do benzeno, como o álcool benzílico, desenvolvem-se nas uvas após o *véraison* (Kalua & Boss, 2009).

Os ácidos fenólicos como o cafeico, o *p*-cumárico e o ferúlico também podem atuar como precursores de compostos de aroma, por reações de conversão, isomerização, oxidação, redução e hidrólise, originando fenóis voláteis. Estes compostos são os responsáveis pelas notas a fumado, madeira, couro e apimentadas (4-vinilguaiacol) e em baixos teores podem ser benéficos para o aroma do vinho (Botelho, 2008).

1.4.1. Produção de compostos fenólicos

Um dos fenómenos mais relevantes na maturação e com elevada importância enológica é a síntese de compostos fenólicos, cujas vias de biossíntese estão presentes e parcialmente ativas logo no início do desenvolvimento da uva (Ali *et al.*, 2010).

Os compostos fenólicos podem ser formados a partir da condensação de 4-fosfato de eritrose, que é um produto intermediário do ciclo das pentoses fosfato, com o ácido fosfoenol-pirúvico (Figura 8). Esta via de biossíntese está principalmente associada à formação de aminoácidos aromáticos, como a fenilalanina e a tirosina, contudo, também pode conduzir à produção de ácido benzóico e cinâmico. Por outro lado, os compostos fenólicos podem ser formados a partir da condensação de três moléculas de acetil coenzima A, derivadas de reações do ciclo de Krebs, levando à formação de um anel benzeno. A condensação deste segundo anel com uma molécula de ácido cinâmico produz os flavonóides. Várias transformações, como hidroxilação, metoxilação, esterificação e glicosilação, conduzem à formação de flavonóides de diferentes famílias e com diferentes funções biológicas na uva (Ali *et al.*, 2010).

Várias enzimas participam nas reações metabólicas e influenciam a síntese de compostos fenólicos, sendo as mais importantes a liase da fenilalanina-amónia e a sintetase da calcona. A primeira localiza-se nas células epidérmicas do bago de uva e nas grainhas, apresentando um máximo de atividade no início do desenvolvimento do bago, no entanto à medida que o bago se aproxima do *véraison*, a sua atividade vai decrescendo. Nas uvas tintas, a sua atividade volta a aumentar no início do *véraison*. Em relação à sintetase da calcona, verifica-se que a sua atividade aumenta muito no início do *véraison*, diminuindo depois drasticamente (Garrido & Borges, 2013, Paixão *et al.*, 2007).

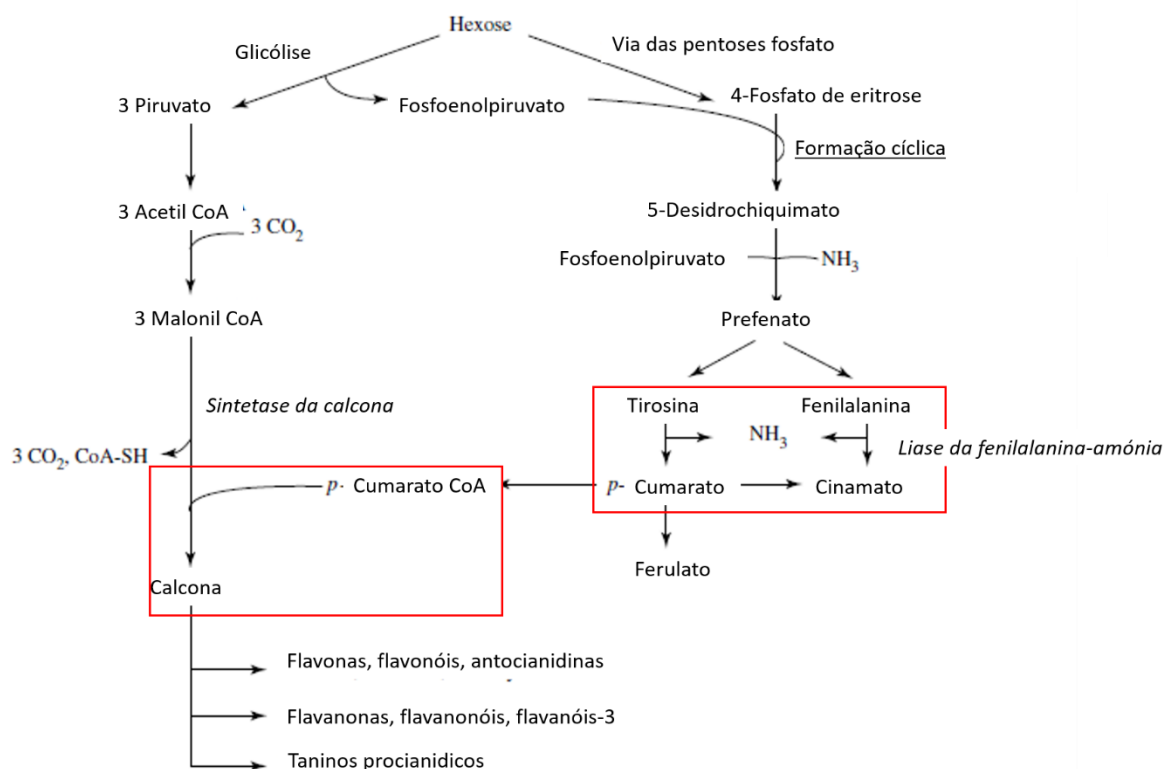


Figura 8 - Vias de biossíntese de compostos fenólicos (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006a).

Os taninos e as antocianinas são os flavonóides que se acumulam em maiores quantidades durante a maturação do bago de uva tinta. Estes compostos fenólicos apresentam elevada importância enológica, tanto pelas suas propriedades físico-químicas, como pelas suas interações durante a maturação da uva e na produção do vinho. A figura 9 descreve a evolução da concentração destes compostos durante o desenvolvimento da uva, sendo que a síntese de antocianinas é residual, ou até nula, durante as primeiras etapas da maturação, atingindo o seu máximo quando a uva está próxima da maturidade. Em relação aos taninos, a sua síntese começa logo no início da maturação atingindo um máximo durante o *véraison*, reduzindo gradualmente, à medida que a uva se aproxima da maturidade (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006a).

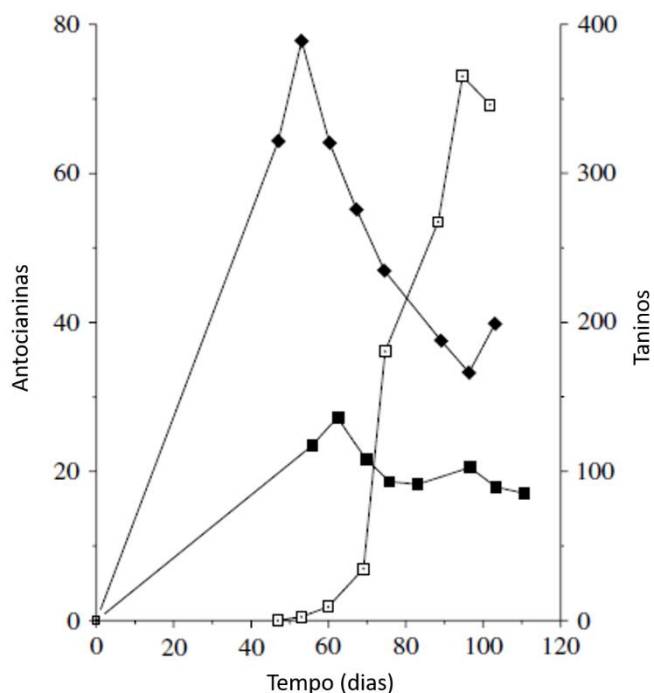


Figura 9 - Evolução dos compostos fenólicos. (resultados expressos em mg/g de peso seco: □, antocianinas na película; ◆, taninos na película; ■, taninos nas grainhas) (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006a).

1.4.1.1. Antocianinas

A acumulação de antocianinas nas uvas durante o amadurecimento depende de diversos fatores, desde as variações metabólicas que existem entre cada cultivar de uva, até ao impacto do homem e do meio ambiente. A acumulação de antocianinas é máxima logo após o *véraison* e começa a diminuir a seguir a esta etapa da maturação do bago. Esta diminuição está relacionada com a formação de complexos contendo as antocianinas, que levam à formação de pigmentos mais estáveis e, conseqüentemente, à diminuição no teor de antocianinas livres (Pérez-Magariño & González-San José, 2004).

Na maioria dos cultivares, a malvidina é a antocianina presente em maior quantidade, encontrando-se tanto na forma de malvidina-3-*O*-glucósido, como de malvidina-3-*O*-acetilglucósido e malvidina-3-*O*-*p*-cumarilglucósido. As restantes antocianinas, nomeadamente, a delphinidina-3-*O*-glucósido, a petunidina-3-*O*-glucósido, a peonidina-3-*O*-glucósido e a cianidina-3-*O*-glucósido encontram-se em quantidades inferiores (Pérez-Magariño & González-San José, 2004).

A delphinidina-3-*O*-glucósido e petunidina-3-*O*-glucósido acumulam-se intensamente pouco depois do *véraison* e os seus teores mantêm-se estáveis durante as restantes fases do amadurecimento. Estes dados estão relacionados com o facto destes

pigmentos serem formados no início da via biossintética, sendo precursores das restantes antocianinas. A malvidina-3-*O*-glucósido, obtida a partir da petunidina-3-*O*-glucósido por ação de metiltransferases, assim como a peonidina-3-*O*-glucósido, apresentam um comportamento semelhante às antocianinas totais, atingindo um máximo logo após o *véraison*, que é seguido de uma diminuição até às últimas fases do amadurecimento, altura em que voltam a aumentar. A semelhança de comportamento entre a malvidina e a peonidina deve-se, principalmente, ao facto de estas serem as antocianinas com as estruturas mais estáveis (Ryan & Revilla, 2003).

1.4.1.2. Taninos condensados

Os taninos condensados, extraídos durante a vinificação, são normalmente associados à adstringência do vinho, contudo, também afetam a cor e a sua estabilidade durante o envelhecimento. Existem 5 unidades monoméricas principais: (i) a (-) epicatequina-(4 β →2) fluroglucinol, cuja quantidade aumenta consistentemente durante o amadurecimento, de 56,3% para 60,3%; (ii) a (-) epigalocatequina-(4 β →2) fluroglucinol, cuja quantidade também sofre um aumento constante durante o amadurecimento, de 21,7% para 28,4%; (iii) a (+) catequina-(4 α →2) fluroglucinol, que diminui consistentemente durante a maturação, de 3,1% para 2,5%; (iv) a (-) epicatequina-3-*O*-galato-(4 β →2) fluroglucinol, que diminui entre o crescimento herbáceo e o *véraison*, voltando a aumentar até ao fim da maturação, variando, globalmente, entre 5,2% e 5,1%; (v) a (+) catequina, cuja percentagem é máxima durante a fase herbácea, situando-se nos 13,8%, e reduzindo gradualmente até atingir um mínimo de 3,7% no fim da maturação. Além disso, os taninos condensados estão ligados, covalentemente, a antocianinas, sugerindo que durante a maturação ocorre a formação natural de procianidinas coradas e que este fenómeno não se limita à formação de complexos durante a vinificação (Kennedy *et al.*, 2001).

1.5. MÉTODOS DE ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Tradicionalmente, a determinação da melhor altura para o começo da vindima é feita a partir da análise de fatores físico-químicos como o pH, a acidez total e o teor de açúcares. Contudo, existem outros parâmetros qualitativos que são determinantes para a produção de vinhos com elevada qualidade, como é o caso do teor em compostos fenólicos.

O acompanhamento da maturação fenólica da uva é essencial para a gestão da vindima, não só porque permite determinar o momento ótimo de colheita da uva, mas também porque permite definir protocolos de vinificação diferenciados, com vista a um vinho com características específicas (González-San José *et al.*, 1991). A análise do teor de compostos fenólicos presentes nas uvas, nomeadamente de antocianinas e taninos, pode ser realizada utilizando vários métodos, descritos por diferentes autores.

1.5.1. Metodologias de quantificação de compostos fenólicos

Diferentes metodologias foram desenvolvidas na tentativa de estimar a maturação fenólica das uvas, sendo que o método mais utilizado é o desenvolvido por Glories e Augustin (1993), descrito por Saint-Cricq *et al.* (1998) e, mais tarde, por Ribéreau-Gayon *et al.* (2006b). O princípio deste método consiste na extração de antocianinas do bago de uva, usando duas soluções acídicas diferentes. A solução A, a pH 1 (HCl 0,1 M), permite uma extração em condições extremas, na medida que promove o rompimento da membrana celular, quebrando as ligações com as proteínas e, consequentemente, libertando o conteúdo dos vacúolos. Assim, todas as antocianinas são extraídas e solubilizadas nesta solução. Por outro lado, a solução B, a pH 3,2 (solução de ácido tartárico a 5 g/L neutralizada com uma solução de NaOH 1 M), permite uma extração em condições mais moderadas e, aproximadamente, comparável à que se realiza no processo de vinificação clássica de vinho tinto. A solução B também é usada para quantificar o conteúdo de compostos fenólicos totais, com base na medição da absorvância a 280 nm (Delrot *et al.*, 2010).

Após a extração, as antocianinas são quantificadas, aplicando o método da descoloração pelo ião bissulfito. As antocianinas na presença de anidrido sulfuroso (SO₂) perdem grande parte da sua coloração. A pH 3,0 o anidrido sulfuroso está na forma de bissulfito, HSO₃⁻, que reage com o catião *flavílium* no carbono 2 das antocianinas, formando um produto de reação incolor. A quantificação das antocianinas é feita pela diferença das absorvâncias a 520 nm entre a solução A ou B com e sem descoloração pelo ião bissulfito. Assim, a concentração de antocianinas é dada pela seguinte formula (Blouin, 1992):

$$C(\text{mg} / \text{L}) = \Delta d \times 875$$

Sendo, C a concentração de antocianinas em mg/L, Δd_2 a diferença entre as absorvâncias a 520 nm da solução com e sem descoloração pelo ião bissulfito e 875 é o declive da reta de calibração das antocianinas (Blouin, 1992).

Ribéreau-Gayon *et al.*, (2006b) refere o facto de que as antocianinas e os taninos são extraídos da película com as mesmas condições, e que um extrato com elevado conteúdo de antocianinas possui também um elevado conteúdo em taninos. Por isso, as antocianinas podem ser consideradas como indicadores dos taninos nas películas (Delrot *et al.*, 2010). Com base nestas considerações, outros parâmetros podem ser calculados, como o cálculo da extratibilidade das antocianinas (EA), através da equação (1):

$$(1) \text{ EA(\%)} = \frac{ApH1,0 - ApH3,2}{ApH1,0} \times 100$$

Onde ApH1,0 representa o teor em antocianinas totais a pH 1 e ApH3,2 representa o teor em antocianinas extratáveis a pH 3,2, expresso em mg/L. Quanto menor for o parâmetro EA, maior será o teor de antocianinas extratáveis (Delrot *et al.*, 2010).

E a contribuição dos taninos provenientes das grainhas (MP), através da equação (2) (Delrot *et al.*, 2010):

$$(2) \text{ MP(\%)} = \frac{Abs\ 280 - (ApH\ 3,2 \times 40)}{Abs\ 280} \times 100$$

Onde Abs280 é o valor da absorvância a 280 nm que corresponde ao teor de compostos fenólicos totais. Ribéreau-Gayon *et al.* (2006b) refere que o valor de Abs280 está correlacionado com a concentração de antocianinas por uma relação aproximada de $Abs280 = ApH3,2 \times 40$, sendo o valor 40, a relação entre o teor de antocianinas e o teor de compostos fenólicos. O parâmetro MP diminui ao longo da maturação, sendo que valores a baixo de 60% indicam que a uva já está madura (Delrot, Medrano, Or, Bavaresco, & Grando, 2010) (Delrot *et al.*, 2010).

1.5.1.1. Método alternativo à metodologia convencional

Um dos principais problemas com a metodologia convencional (método de Glories) é a utilização de tempos de maceração elevados (4 horas), tornando-o inviável para determinar em tempo útil o grau de maturação fenólica de um grande número de amostras de bagos de uvas. Para contornar este problema, surgiu um método que utiliza os mesmos princípios da metodologia convencional, mas permite reduzir o tempo de

maceração para apenas minutos, diminuindo ainda o material necessário para a análise - o Método Rápido (MRap). O MRap é um método comercial que consiste na extração dos compostos fenólicos presentes na solução acidificada de uvas, sob agitação, a uma temperatura de 78 °C durante 1 min. Posteriormente, a solução é filtrada, diluída e a absorvância é lida no espectrofotômetro a comprimentos de onda de 280 e 520 nm. Os resultados são depois introduzidos no software, desenvolvido para esta metodologia, que fornece o índice de compostos fenólicos totais, o conteúdo de antocianinas totais e extratáveis, o conteúdo de taninos e a cor provável esperada dos vinhos. A razão entre a absorvância a 280 e a 520 nm (A280/A520) corresponde ao índice de maturação fenólica (IMF). Este índice foi proposto pela empresa que desenvolveu o método e permite estimar o estado maturação das uvas, como mostra a tabela 1 (Bioenos, 2013).

Tabela 1 – A relação entre os valores do IMF e o grau de maturação da uva (Bioenos, 2013)

2,0 > IMF > 1,70	Uvas verdes e adstringentes
1,70 > IMF > 1,60	Uvas com adstringência média
1,60 > IMF > 1,50	Uvas maduras e suaves
IMF > 2,0	Uvas não maduras, devido ao bloqueio da maturação por stress
IMF > 2,50	Uvas infetadas com insetos

Os compostos fenólicos da uva começam a ser sintetizados logo desde o início do desenvolvimento da uva. No entanto, a evolução destes compostos nas grainhas e na película ocorrem de forma diferente. Os valores de IMF acima de 1,7 estão associados ao período herbáceo, devido à acumulação de polifenóis e ao baixo teor de antocianinas. Ao longo da maturação, as grainhas sofrem uma grande redução no conteúdo de compostos fenólicos, que pode chegar a 90% nos monómeros de flavan-3-ol e de 60% nas procianidinas. Por outro lado, as películas verificam um aumento gradual no teor de compostos fenólicos ao longo da maturação. Este aumento está relacionado com a síntese de antocianinas, que se inicia logo após o *véraison*. Durante este processo, o IMF vai diminuindo até atingir valores ideais de 1,5 (Ali *et al.*, 2010; Kennedy *et al.*, 2000).

Por outro lado, quando as uvas são sujeitas a condições de stress, nomeadamente o ataque de fungos, insetos e ação de fitotoxinas, formam metabolitos secundários como mecanismo de defesa. Os compostos fenólicos, como resveratrol, são um exemplo desses

metabolitos e permitem inibir a ação indesejável de diversas enzimas. Por este motivos, pode-se associar os valores de $IMF > 2$ com as condições de stress descritas (Cai *et al.*, 2012).

1.6. OBJETIVOS DO TRABALHO

Este trabalho está integrado na procura constante do setor empresarial por soluções mais rápidas, práticas e fiáveis, tanto para garantir um melhor controlo da qualidade dentro da empresa como para satisfazer as necessidades dos clientes. No caso da empresa SAI Segurança Alimentar Integrada Lda, surgiu a necessidade de validar um novo método para a avaliação da maturação fenólica de uvas tintas, capaz de responder a um número elevado de amostras/dia, utilizando um sistema que permite encurtar o tempo de extração de 4 h (método clássico) para apenas alguns minutos. Desta forma, a empresa poderá disponibilizar aos seus clientes um novo serviço para controlo da maturação fenólica das uvas tintas, permitindo aconselhar e indicar o momento ideal da vindima e o tipo de características das uvas. Assim, os enólogos podem definir de forma mais precisa e rigorosa a data da vindima, e personalizar o processo de vinificação dessas mesmas uvas, em função do teor de compostos fenólicos e sua extratibilidade.

CAPÍTULO 2 - METODOLOGIA

2.1. AMOSTRAGEM

Neste trabalho foram usadas 53 amostras de uvas tintas, fornecidas por 9 produtores das principais regiões vitivinícolas nacionais, como o Alentejo (A), Tejo (T), Lisboa (L), Bairrada (B), Douro (D), Dão (Da) e Região dos Vinhos Verdes (RVV). Estas amostras, disponibilizadas entre agosto e outubro de 2016, encontravam-se em diferentes estádios de maturação, e eram de diferentes castas, nomeadamente Syrah (Syr), Cabernet Sauvignon (CS), Alicante Bouschet (AB), Touriga Nacional (TN), Touriga Franca (TF), Castelão (C), Aragonez (Az), Baga (Bg), Merlot (M), Vinhão (V) e Espadeiro (Esp). A amostragem e do acondicionamento até às instalações da SAI foi da responsabilidade dos fornecedores.

Os bagos das diferentes amostras foram divididos, de forma aleatória e consoante as quantidades necessárias, para a realização da análise dos compostos fenólicos das uvas pelas diferentes metodologias e para a análise do teor alcoólico provável (TAP), pH e acidez total (AT).

Além das amostras uvas também foram fornecidas 13 amostras de vinhos produzidos pelos fornecedores das amostras de uvas.

2.2. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Para a realização das análises físico-químicas, procedeu-se ao esmagamento de cerca de 100 bagos de uva, recolhendo-se o mosto.

O teor alcoólico provável (TAP) foi determinado por refratometria, sendo usado um refratómetro portátil (figura 10), cujos resultados foram expressos em % de volume de álcool provável.



Figura 10 - Refratómetro portátil.

O pH ou acidez real consiste na disponibilidade de iões H^+ no vinho. O medidor de pH, da marca Crison, foi calibrado antes de cada utilização com soluções padrão (pH 9,21,

7,00 e 4,01). Mergulhou-se o eletrodo na amostra a analisar, cuja temperatura devia estar tão próxima quanto possível dos 20 °C e fez-se a leitura direta do pH da amostra.

A determinação da acidez titulável (AT) foi realizada através de uma titulação ácido-base recorrendo ao hidróxido de sódio como titulante e azul de bromotimol como indicador. A 10 mL de amostra de mosto colocada num erlenmeyer, adicionou-se 30 mL de água destilada, 1 ml de azul de bromotimol e titulou-se a mistura com hidróxido de sódio 0,1 M até ao aparecimento da coloração azul-esverdeada. A AT na amostra é determinada por:

$$AT = V \text{ (mL)} \times 0,75$$

onde V é o volume gasto de titulante, em mL. A acidez total é expressa em gramas de ácido tartárico por litro.

2.3. MÉTODO DE GLORIES

A determinação de compostos fenólicos realizou-se segundo a metodologia de Glories (1990). Inicialmente, recolheu-se 200 bagos de uva inteiros que foram triturados recorrendo a uma liquidificadora (Philips Problend 6). Após triturados, retirou-se 50 g de amostra e adicionou-se 60 mL de água destilada onde o pH foi ajustado a 1 com uma solução aquosa de HCl 37% a pH 1,0. Simultaneamente, retirou-se 50 g de amostra e adicionou-se 60 mL de solução de ácido tartárico a 5 g/L a pH 3,2. Ambas as preparações foram realizadas em duplicado. Posteriormente, as quatro soluções ficam a macerar durante 4 horas, agitando de 15 em 15 minutos (figura 11).



Figura 11 - Maceração das amostras uvas trituradas a solução (a) pH 1,0 e (b) pH 3,2.

Após o tempo de maceração, as preparações foram filtradas com papel de filtro, dando origem a duas soluções, em duplicado, a pH 1,0 e pH 3,2. A todas soluções aplicou-se o método de determinação de antocianinas por descoloração com SO₂ de Glories, descrito por Ribéreau-Gayon *et al.* (2006b).

A cada uma das soluções filtradas (1 mL) adicionou-se 1 mL EtOH 0,1% HCl e 20 mL HCl 2% (v/v). A partir destas estas soluções, após homogeneizadas, foram preparadas as seguintes soluções:

Solução 1 (pH 1,0) = 10 ml solução anterior + 4 ml H₂O

Solução 2 (pH 1,0) = 10 ml solução anterior + 4 ml bissulfito sódio

Solução 1 (pH 3,2) = 10 ml solução anterior + 4 ml H₂O

Solução 2 (pH 3,2) = 10 ml solução anterior + 4 ml bissulfito sódio

A leitura da absorvância a 520 nm foi feita com uma célula plástico de 1 cm de espessura. O equipamento usado foi um espectrofotômetro (Thermo Scientific Genesys 10 UV).

A concentração das amostras em antocianinas totais e antocianinas extratáveis foram calculadas pelas seguintes equações:

$$C_{\text{(Totais)}} \text{ (mg/L)} = \Delta d_2 \times 875 \rightarrow \text{(Soluções pH 1,0)}$$

$$C_{\text{(Extratáveis)}} \text{ (mg/L)} = \Delta d_2 \times 875 \rightarrow \text{(Soluções pH 3,2)}$$

Sendo d_2 a diferença entre a absorvância a 520 nm das soluções acima descritas como solução 1 e solução 2, para cada pH.

A determinação do índice de polifenóis totais (IPT) foi feita através da solução filtrada da maceração de 4 horas a pH 3,2, sendo que diluída em 1/100 com água destilada e lida a absorvância a 280 nm, usando uma célula de quartzo de 1 cm.

Para o cálculo do valor de IPT aplicou-se a seguinte equação:

$$I_{280} = \text{Abs}_{280} \times \text{diluição}$$

A partir das análises realizadas às soluções preparadas, calculou-se o índice de maturidade celular, também designado de extratibilidade de antocianinas (EA), segundo a equação apresentada abaixo (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b):

$$AE(\%) = \frac{ApH1,0 - ApH3,2}{ApH1,0} \times 100$$

2.4. MÉTODO RÁPIDO (MRAP)

As uvas inteiras foram trituradas durante 20 segundos a 18000 rpm. Esse triturado foi colocado no copo metálico e introduzido no equipamento da marca Bioenos, como ilustrado na figura 12. Posteriormente, adicionou-se 4 mL de Reativo B e 1 mL de Reativo A e colocou-se a tampa no copo metálico e a sonda de temperatura. Após atingir os 78 °C durante 1 min, o equipamento emitiu um alarme, momento em que se retirou a sonda da temperatura e o copo do banho.



Figura 12 – Maceração das uvas trituradas no equipamento MRap.

Seguidamente, colocou-se o filtro metálico na ponta de um micropipeta de 5 mL e recolheu-se cerca de 3 mL de extrato do copo metálico. Cerca de 0,5 mL de extrato filtrado foram colocados em 2 *ependorfs* de 1,5 mL de volume total e centrifugados durante 2 min a 14500 rpm. Colocou-se 40 µL de extrato centrifugado e 3960 µL de HCl 2% no tubo de ensaio 1 e 100 µL de extrato centrifugado e 1900µL de solução Tampão RC no tubo de ensaio 2.

As absorvâncias do tubo 1 foram medidas a 280 nm (cuvete de 1 cm de quartzo) e 520 nm (cuvete de 1 cm de plástico), tendo a solução HCl 2% como zero. No tubo 2 mediu-se as absorvâncias a 420, 520 e 620 nm (cuvete de 1 cm de plástico), tendo o tampão RC como zero.

As absorvâncias obtidas foram multiplicadas pelo fator de diluição, tendo o tubo 1 um fator de 100 e no tubo 2 um fator de 20. Depois introduziu-se os valores no software, obtendo-se os resultados das antocianinas totais (AntT), antocianinas extratáveis (AntE),

índice de compostos fenólicos totais (IPT), índice de maturação fenólica (IMF) e a cor esperada provável do vinho após fermentação.

2.5. MÉTODO HÍBRIDO

O método híbrido (HMS) baseia-se na metodologia de Glories, mas é sujeito a aquecimento no equipamento utilizado no MRap. As uvas inteiras foram trituradas durante 20 s a 18000 rpm. Esse triturado foi colocado no copo metálico e introduzido no equipamento. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de solução a pH 3,2 e 4 mL de solução a pH 1 (soluções iguais às usadas no método de Glories), e colocou-se a tampa no copo metálico e a sonda de temperatura. Após atingir os 78°C manteve-se durante 1 min. Seguidamente, colocou-se o filtro metálico na ponta de um micropipeta de 5 mL e recolheu-se cerca de 3 mL de extrato do copo metálico. 1,0 mL de extrato filtrado foi colocado em 2 *ependorfs* de 1,5 mL, que foram centrifugados durante 2 min a 14500 rpm. Retirou-se 0,250 mL de amostra centrifugada e adicionou-se 250 mL EtOH 0,1% HCl e 5 mL HCl 20% (v/v). A 2,5 mL da solução anterior adicionou-se 1 mL de H₂O e aos outros 2,5 mL adicionou-se 1 mL bissulfito de sódio a 15%.

Mediram-se as absorvâncias a 520 nm e a 280 nm, usando uma célula de plástico e de quartzo de 1 cm, para determinar as antocianinas e os IPT, respetivamente.

2.6. ESPETROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

O vinho contém vários compostos nas formas molecular e iónica capazes de absorver energia de comprimentos de onda na zona dos infravermelhos. Através da passagem de radiação nesta zona do espectro, estes compostos emitem radiação com comprimentos de onda perfeitamente definidos de acordo com a sua estrutura. Através da integração dos espectros por Transformada de Fourier e recorrendo a uma reta de calibração definida com vinhos padrão, é possível determinar a concentração dos vários compostos que caracterizam o vinho, obtendo através de uma única metodologia, todos os parâmetros físico-químicos do produto.

O sistema Bacchus (França) é constituído pelos seguintes componentes: espectrofotómetro de FTIR Nicolet 380 da Thermo Corporation (Dinamarca), acoplado a um espectrofotómetro de ultravioleta/visível (Avatar) e a um amostrador automático

M.S.U. (França). O programa Bacchus Acquisiton, permite a análise de amostras, ajuste dos parâmetros relacionados com as amostras, visualização dos resultados, seleção e otimização de diferentes calibrações, gestão de utilizadores e manutenção do equipamento (figura13).



Figura 13 - Sistema Bacchus.

As amostras dos vinhos foram desgaseificadas, introduzidas em tubos de ensaio e colocadas no amostrador automático. Na análise realizada pelo FTIR obtiveram-se os valores do pH, massa volúmica, teor alcoólico (TA), acidez volátil (AV), acidez total (AT), açúcares redutores (AR), pH, massa volúmica (MV) e teor em ácido málico e láctico.

2.7. DETERMINAÇÃO DA COR DO VINHO

A intensidade e a tonalidade da cor dos vinhos foram determinadas por leitura direta, após a diluição apropriada, das absorvâncias a 420 nm, 520 nm e 620 nm, que correspondem aos tons amarelos, vermelhos e azuis, respetivamente.

A intensidade da cor (IC) foi calculada pelo somatório das absorvâncias a 420, 520 e 620 nm, tendo em consideração o fator de diluição (fd). Este fator variou entre amostras, sendo acertado para que os valores se encontrassem no intervalo de linearidade do espectrofotómetro.

$$IC = \sum Abs(420 + 520 + 620nm) \times fd$$

2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores apresentados neste trabalho correspondem à média aritmética de duplicados. Os coeficientes de regressão linear foram obtidos usando o software Microsoft Office Excel.

Todas as validações estatísticas foram realizadas para um intervalo de confiança de 95% ($IC_{95\%}$), considerando que $IC_{95\%} < 0,05$ corresponde a uma correlação significativa, $IC < 0,01$ corresponde a uma correlação muito significativa e que $IC_{95\%} < 0,001$ corresponde a uma correlação altamente significativa.

As correlações entre os parâmetros físico-químicos das amostras (entre $t_{inicial}$ e t_{final}) foram determinadas usando o teste t -student unicaudal de amostras emparelhadas. As determinações do grau de significância das correlações entre os diferentes métodos foram estabelecidas usando o método Anova, através do software Microsoft Office Excel.

CAPÍTULO 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. CARATERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE UVAS

Atualmente, o estado de maturação da uva é avaliado a partir dos parâmetros físico-químicos, como a acidez titulável (AT), o pH e o teor alcoólico provável (TAP), sendo este último determinado através da concentração de açúcares (Nogales-Bueno *et al.*, 2013). Na tabela 2 estão expressos os valores dos diferentes parâmetros para os mostos das diferentes castas e produtores ao longo da maturação da uva.

Tabela 2 - Parâmetros físico-químicos do mosto das diferentes amostras ao longo da maturação (inicial e final).

Casta	Produtor*	TAP _{inicial} (%vol)	TAP _{final} (%vol)	pH _{inicial}	pH _{final}	AT _{inicial} (g/L)	AT _{final} (g/L)
Syr	LH	11,4 ± 0,1	15,6 ± 0,0	3,26 ± 0,02	3,64 ± 0,01	5,40 ± 0,28	4,65 ± 0,14
	TA1	12,5 ± 0,0	14,2 ± 0,2	3,18 ± 0,01	3,37 ± 0,00	4,99 ± 0,07	4,39 ± 0,07
	TA2	13,4 ± 0,1	14,8 ± 0,0	3,28 ± 0,01	3,56 ± 0,01	4,13 ± 0,00	3,68 ± 0,14
	LP1	11,2 ± 0,0	13,0 ± 0,0	3,14 ± 0,01	3,40 ± 0,01	5,25 ± 0,00	4,24 ± 0,21
	LP2	11,6 ± 0,0	12,8 ± 0,1	3,25 ± 0,01	3,42 ± 0,01	4,95 ± 0,14	3,79 ± 0,07
	BPL	12,7 ± 0,1	-	3,23 ± 0,00	-	5,25 ± 0,00	-
	AW	13,6 ± 0,0	-	3,38 ± 0,01	-	3,68 ± 0,00	-
CS	LH1	10,2±0,1	14,9±0,1	3,13±0,02	3,57±0,01	6,20±0,21	4,28±0,14
	LH2	10,8±0,2	14,5±0,1	3,22±0,01	3,27±0,01	5,60±0,28	4,16±0,21
	LC	9,9±0,1	-	3,16±0,02	-	5,85±0,14	-
	TA	12,8±0,0	14,9±0,1	3,26±0,01	3,36±0,01	5,18±0,14	4,80±0,0
TN	LH1	10,1±0,1	15,0±0,0	3,56±0,02	4,01±0,01	4,50±0,21	3,38±0,14
	LH2	13,0±0,0	-	3,75±0,01	-	4,95±0,14	-
	LC	7,9±0,1	-	2,88 ± 0,02	-	7,58±0,14	-
	TA	12,5 ± 0,06	14,2±0,0	3,40±0,01	3,78±0,02	4,16±0,07	3,23±0,00
	DCPA	12,4±0,0	-	3,93±0,02	-	2,66±0,07	-
	DaCPA	10,0±0,01	-	3,08±0,01	-	6,00±0,00	-
AB	LC	7,2±0,0	-	2,79±0,01	-	7,39±0,07	-
	TA1	10,9±0,0	12,0±0,0	3,28±0,01	3,44±0,01	3,94±0,07	3,41±0,07
	TA2	11,6±0,0	13,0±0,0	3,33±0,01	3,60±0,01	3,56±0,07	3,34±0,07
C	TA	13,1±0,1	15,1±0,1	3,37±0,01	3,56±0,01	3,45±0,00	3,45±0,00
	LC	8,2±0,0	-	3,01±0,01	-	5,66±0,07	-
Az	LH1	15,0±0,0	-	4,12±0,02	-	3,26±0,07	-
	LH2	16,6±0,0	-	4,28±0,01	-	3,49±0,07	-
	AW	13,4±0,0	-	4,27±0,01	-	3,00±0,14	-
TF	TA	11,6±0,0	13,0±0,2	3,5±0,02	3,94±0,01	3,75±0,00	3,45±0,14
M	LP	12,8±0,0	14,8±0,0	3,38±0,01	3,48±0,01	4,13±0,14	3,34±0,07
Bg	BPL	10,1±0,1	-	2,96±0,01	-	6,11±0,07	-
Esp	RVV	11,7±0,2	-	3,11±0,02	-	6,68±0,14	-

*Caracterização dos produtores → 1ª Letra: Região; 2ª Letra: código do produtor. Algarismo: parcela da vinha.

Durante o amadurecimento da uva, ocorre o aumento do pH e do TAP enquanto a AT diminui (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006a), estando os resultados obtidos de acordo com o esperado. Na casta Syr verificou-se uma variabilidade entre amostras de produtores de diferentes regiões e entre produtores das mesmas regiões. Estas diferenças devem-se aos climas característicos de cada região e o tipo de acompanhamento feito pelo produtor. Dados da literatura apresentaram valores de pH ligeiramente mais elevados (pH=3,87) e valores de TAP inferiores (13,9%), com exceção do produtor LP (Lima *et al.*, 2015). Estes teores mais elevados de TAP e mais baixos de pH demonstram que as amostras estudadas tinham os solutos mais concentrados. Tal, pode ser justificado, com as elevadas temperaturas registadas na época de vindima que podem ter desencadeado stress hídrico (Niepoort S.A., 2016; Panceri *et al.*, 2013).

Nas castas CS, AB e M, não se verificaram grandes flutuações, independentemente da região e do produtor. Comparando com a bibliografia, os valores de pH foram semelhantes, no entanto, tal como na casta Syr, os valores de TAP foram mais elevados, indicando maiores concentrações de açúcares (Leeuwen *et al.*, 2004).

Nas castas nacionais (C, TF e TN), apenas se pode comparar a variabilidade para a casta TN, onde se verificou diferenças nos valores de amostras da região do Tejo e Lisboa. Por outro lado, para as castas C, TF e TN, os valores de TAP descritos na literatura foram, respetivamente, 13,6, 12,5 e 13,9 %, sendo inferiores aos obtidos neste estudo. Do mesmo modo, os valores de pH descritos na literatura (2,98; 3,30; 3,19) também foram inferiores aos obtidos. Estes resultados sugerem que as uvas utilizadas neste trabalho estavam mais amadurecidas. Além disso os valores da literatura referem-se à região do Dão, o que também pode justificar a diferença pois as condições climáticas da região são diferentes (Costa *et al.*, 2015).

Outras castas (OC), como Espadeiro, Baga e Aragonez, não permitiram a comparação dos parâmetros analíticos em diferentes intervalos de tempo, uma vez que só foi fornecida uma amostra apenas num tempo de maturação.

A casta vinhão foi acompanhada ao longo de 20 dias, após o *véraison*, e verificou-se que AT diminuiu ao longo do tempo e o pH e TAP aumentou (figura 14 e figura 15), estando de acordo com a literatura (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006a). Contudo, analisando amostra final a AT foi superior (10,95 mg/L) aos valores encontrados na literatura (7,4 mg/L), para vinhos desenvolvidos a partir de uvas desta casta. Na amostra mais madura, o valor de pH obtido (2,96) divergiu dos dados da bibliografia, para o vinho (3,4). Por

outro lado, o TAP da amostra mais madura foi 9,0%, estando ligeiramente mais baixos do que os valores encontrados nos vinhos (9,2 – 9,9 mg/L). Os dados da acidez e do TAP indicam que as uvas não estariam no estado de maturação ideal (Castillo.Sánchez *et al.*, 2008).

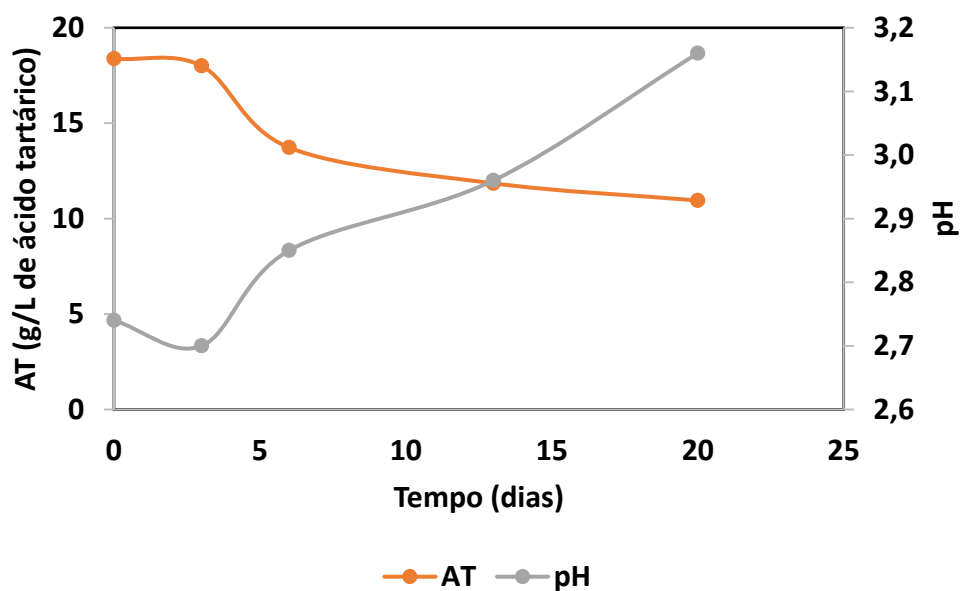


Figura 14 - Evolução da AT e pH do mosto da casta vinhão ao longo do tempo.

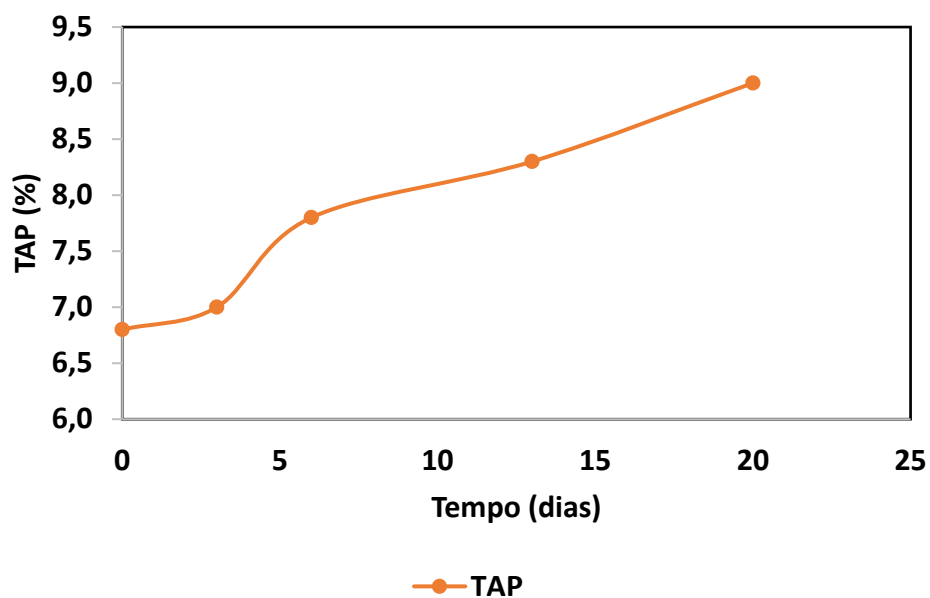


Figura 15 - Evolução da TAP do mosto da casta vinhão ao longo do tempo.

3.2. MÉTODO DE GLORIES

Neste trabalho, o conteúdo de compostos fenólicos presentes nas uvas da casta Vinhão, foi acompanhado ao longo de 20 dias, após *véraison*. A figura 16 ilustra a evolução, ao longo do tempo, da concentração de antocianinas totais (AntT) e antocianinas extratáveis (AntE) das amostras. Os coeficientes de regressão demonstram a existência de uma relação linear.

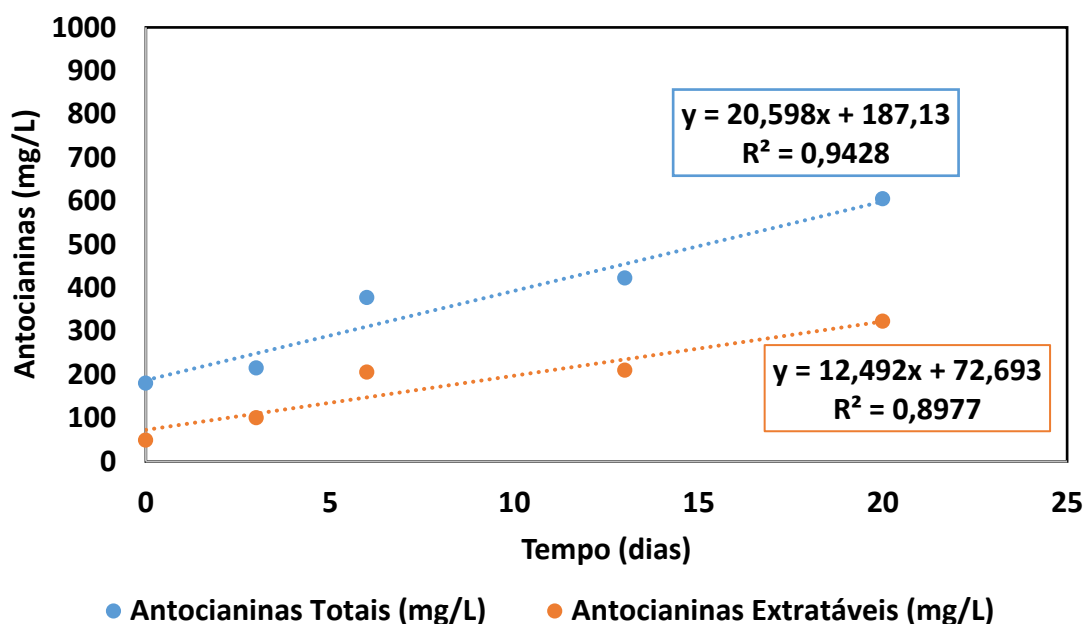


Figura 16 - Evolução das antocianinas totais e extratáveis de uvas da casta vinhão ao longo do tempo.

Relativamente às AntT da casta Vinhão verificou-se que entre a primeira e a última amostra, a concentração de antocianinas triplicou. Esta observação está de acordo com a bibliografia encontrada para outras castas, onde ocorreu um aumento numa proporção semelhante, para intervalos de tempo idênticos (Navarro *et al.*, 2008).

No entanto, para a casta vinhão, a bibliografia encontrada apenas tinha a caracterização de antocianinas para amostras de vinhos. Nestes vinhos, analisados por HPLC, a concentração de AntT variaram entre 1835 e 2000 mg/L, contrastando com os valores obtidos neste trabalho, em que as uvas mais maduras apresentaram concentrações de 600 mg/L. Esta diferença pode estar relacionada com o facto de as uvas não estarem no estado de maturação fenólica ideal. Por outro lado, a quantificação por HPLC nos vinhos, não é influenciada pela temperatura e pH enquanto a extração das AntT, pelo método de Glories, realizou-se a temperaturas abaixo dos 18°C, dificultando a extração

e, conseqüentemente, obtendo-se concentrações mais baixas de antocianinas (Kontoudakis *et al.*, 2010).

As AntE foram extraídas a pH 3,2 e representam a fração de antocianinas obtidas durante o processo de vinificação. Tal como aconteceu nas AntT, as AntE das amostras da casta Vinhão também aumentaram ao longo do tempo, ainda que mais lentamente (declive inferior ao declive das antocianinas totais).

Um parâmetro que está associado às AntE é a extratibilidade das antocianinas (EA), que representa a percentagem de AntT que não foram extraídas da amostra. As percentagens obtidas para casta Vinhão oscilaram entre 73% e 47%, como mostra a figura 17.

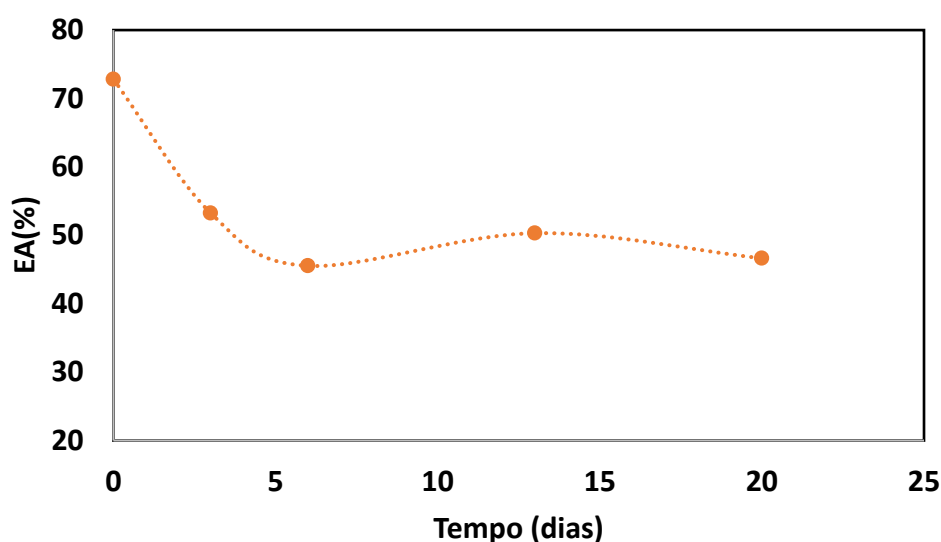


Figura 17 - Extratibilidade das antocianinas ao longo do tempo.

Estes valores estão de acordo com a literatura, atendendo que a EA deve variar entre 70% e 20%. No entanto, no momento da vindima, deve estar abaixo de 30%, reforçando a ideia de que estas uvas ainda não estavam no momento ideal para vindimar (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006a).

As outras castas que compõem a amostragem, como Syr, CS, TN, AB, C e M, apenas permitiram comparar a primeira a amostra fornecidas e a última, como mostra a tabela 3.

Tabela 3 – Evolução com a maturação das AntT e EA das diferentes castas.

Casta	Produtor*	AntT_{inicial} (mg/L)	AntT_{final} (mg/L)	EA_{inicial} (%)	EA_{final} (%)
Syr	LH	511,88	573,56	58,89	48,38
	TA1	307,13	332,94	59,83	53,88
	TA2	391,56	420,00	57,29	56,98
	LP	502,25	504,44	78,31	58,80
CS	LH	287,88	499,19	81,76	54,86
	TA	463,75	532,00	50,41	43,68
TN	LH	429,63	488,69	78,62	45,93
AB	TA	441,00	448,88	59,75	56,85
C	TA	433,56	510,56	53,73	48,23
M	LP	462,44	553,00	70,73	63,01

*Caracterização dos produtores → 1ª Letra: Região; 2ª Letra: código do produtor. Algarismo: parcela da vinha.

As AntT aumentaram em todas as amostras, independentemente da casta e da região de origem, enquanto os valores de EA diminuíram, indicando que a proporção de AntE aumentou em relação AntT, o que está de acordo os resultados obtidos na bibliografia (Kontoudakis *et al.*, 2010).

3.3. MÉTODO RÁPIDO

As metodologias convencionais, como o método de Glories, possuem longos tempos de extração dos compostos fenólicos, inviabilizando a sua aplicação à escala industrial. Para contornar este problema surgiu uma metodologia alternativa, o método rápido (MRap). Com o objetivo de verificar a fiabilidade desta nova metodologia, foram comparados os resultados obtidos através da metodologia convencional e os resultados obtidos pelo MRap. Para todos os parâmetros e castas analisados, foram realizadas correlações entre os métodos.

3.3.1. Antocianinas Totais

Através da análise dos gráficos da figura 18, constatou-se que os valores de AntT obtidos pelo método de Glories e pelo MRap apresentam coeficientes de determinação superiores a 0,8. Através da análise de significância das regressões, classificou-se como: (i) altamente significativas ($p < 0,001$) as regressões para as castas Syrah, CS e Outras Castas (OC - amostras de TF, Castelão, Merlot, Baga, Aragonez e Espadeiro, devido ao

reduzido número de amostras para cada casta fez-se a sua junção); (ii) muito significativas ($p < 0,01$) para a casta TN; (iii) significativa ($p < 0,05$) para a casta AB.

As análises das retas de todas as castas mostram declives elevados ($m_A=3,2$; $m_B=2,8$; $m_C=4,6$; $m_D=4,0$; $m_E=2,8$), indicando que em média a extração pelo MRap foi cerca de 3,5 vezes superior em relação ao Glories. Esta extração superior pode estar relacionada com a utilização de temperaturas elevadas ($T=78^{\circ}\text{C}$) durante o procedimento de análise, permitindo uma extração mais eficiente das antocianinas (Ju & Howard, 2003). Num estudo realizado com uvas da casta Aragonéz verificou-se que a extração de antocianinas, para o mesmo intervalo de tempo, a 15°C foi 8 vezes inferior à extração realizada a 40°C (Marquez *et al.*, 2014).

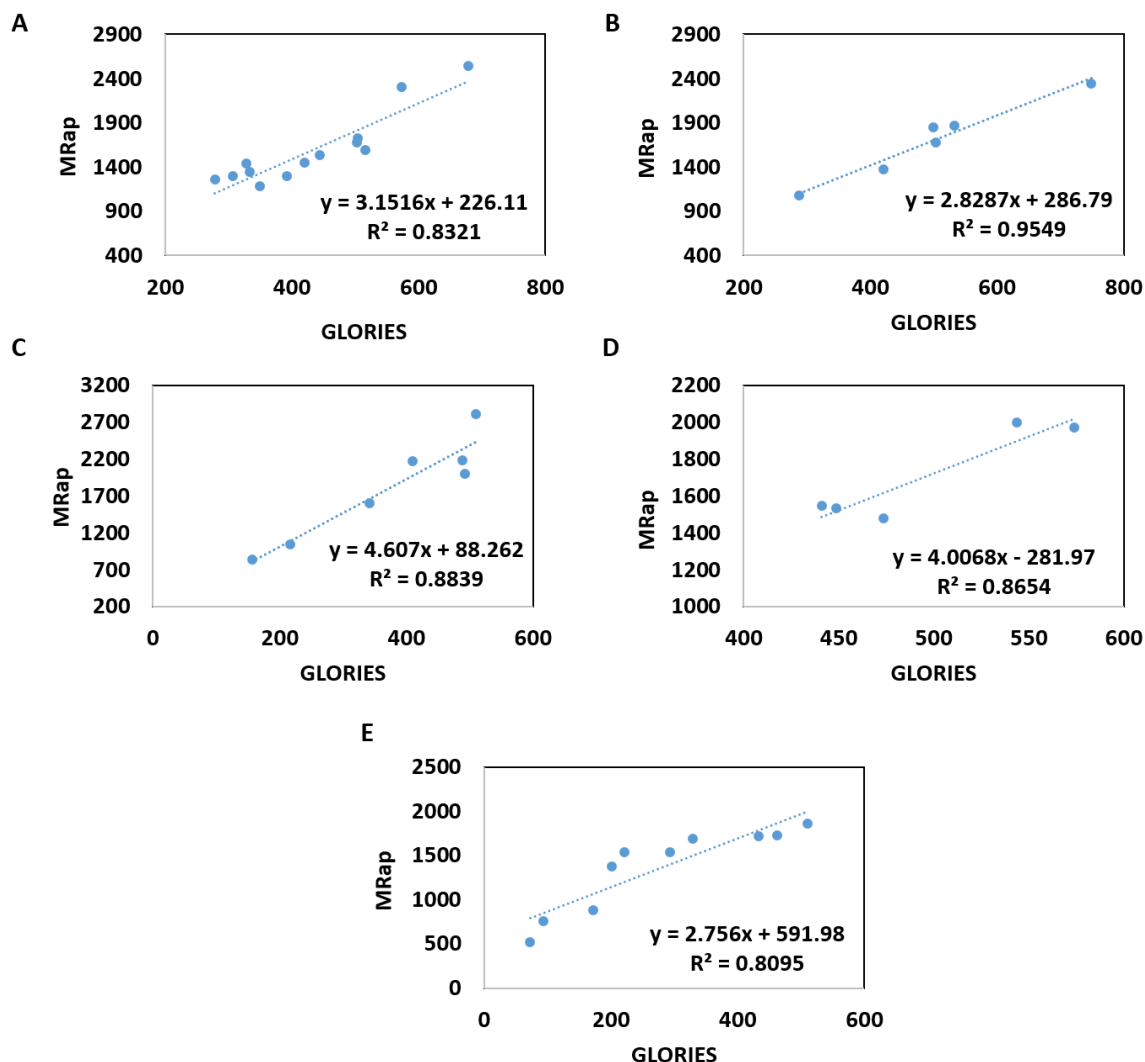


Figura 18 - Comparação entre os valores das AntT, em mg/L, de diferentes castas obtidos pelo método de Glories e pelo MRap. A – Syr; B – CS; C – TN; D – AB; E – OC.

3.3.2. Antocianinas extratáveis

A figura 19 apresenta os gráficos de correlação dos valores de AntE obtidos pelos dois métodos. Para este parâmetro os coeficientes de regressão linear entre os métodos apresentaram uma maior dispersão entre castas, variando entre 0,9416 para as OC e 0,376 para a casta CS.

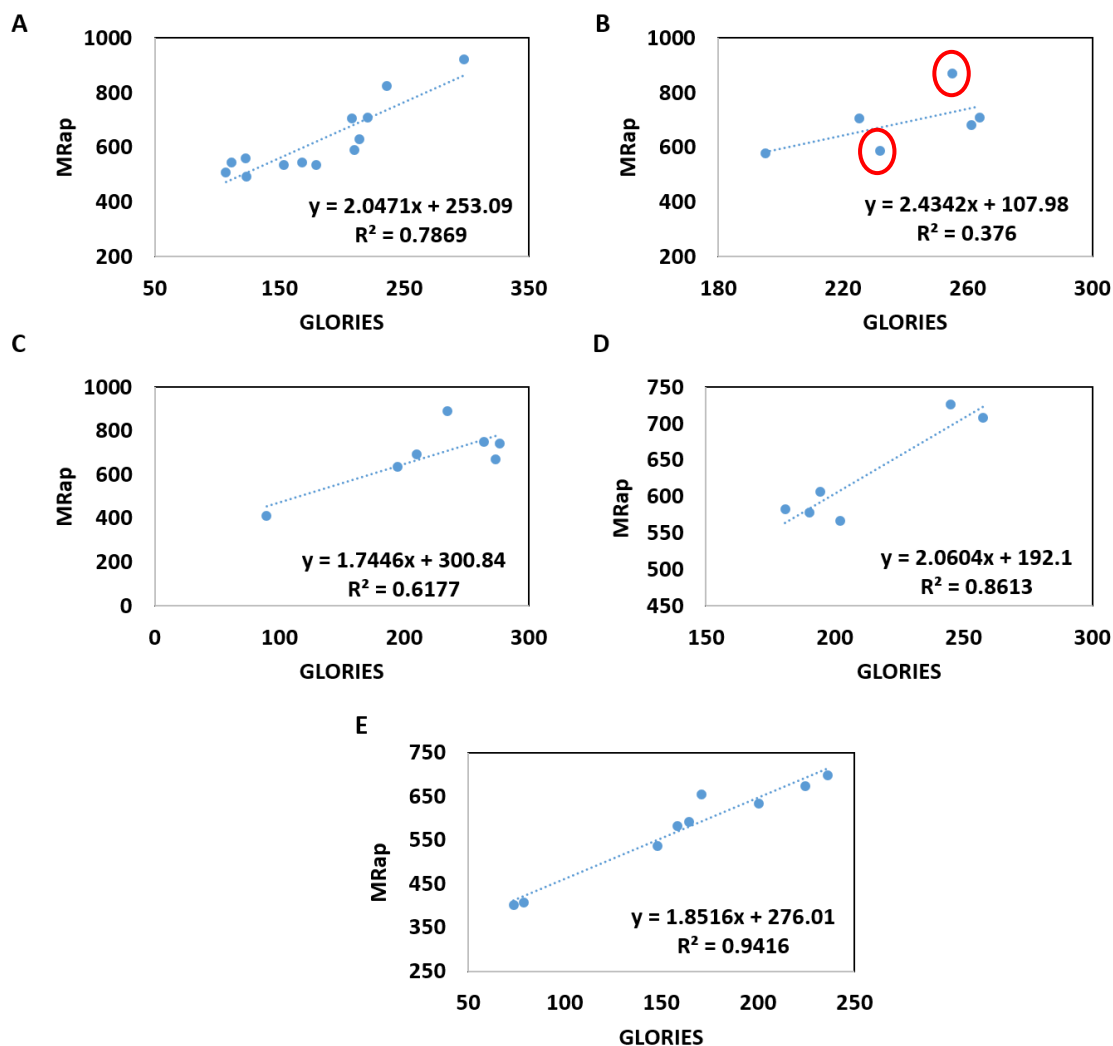


Figura 19 - Comparação entre os valores das AntE, em mg/L, de diferentes castas obtidos pelo método de Glories e pelo MRap. A – Syr; B – CS; C – TN; D – AB; E – OC.

Através da análise de significância das regressões, classificou-se como: (i) altamente significativas ($p < 0,001$) as regressões para as castas Syrah e OC; (ii) muito significativas ($p < 0,01$) para a casta AB; (iii) significativa ($p < 0,05$) para a casta TN; (iv) não significativa para a casta CS. De modo geral, as correlações obtidas para AntE foram piores relativamente às AntT, em particular para a casta CS, não sendo possível estabelecer uma relação entre os métodos. Uma possível justificação para estas

observações, é que no método de Glories a determinação das AntE é feita a partir de uma medição direta de uma solução a pH 3,2 enquanto no MRap são determinadas indiretamente, usando calibrações prévias baseadas na relação entre AntT e IMF, ou seja, os valores de AntE dados pelo software são suscetíveis às variações dos outros parâmetros (Bioenos, 2013). Além disso, ao analisar as regiões e os produtores de cada ponto da regressão para a casta CS, constatou-se que os valores que mais se afastaram da reta diziam respeito à mesma região e ao mesmo produtor (figura 19B), sugerindo que as condições manipulação da uva e/ou clima, podem estar na causa da desregulação de algum dos parâmetros usados para o cálculo indireto das AntE.

Tal como aconteceu para AntT, também os declives das retas são elevados ($m_A=2,0471$; $m_C=1,7446$; $m_D=2,0604$; $m_E=1,8516$), indicando que em média a extração pelo MRap foi cerca de 2 vezes superior. Tal como verificado para o conteúdo em AntT, esta extração superior pode estar relacionada com o efeito da temperatura elevada ($T=78^{\circ}\text{C}$) usado na metodologia do MRap (Ju & Howard, 2013).

3.3.3. Índice de compostos fenólicos totais

A figura 20 apresenta os valores dos IPT obtidos pelos dois métodos para as diferentes castas. Para este parâmetro os coeficientes de regressão linear entre os métodos foram superiores a 0,8 para todas as castas, à exceção da casta CS que obteve um coeficiente de 0,5612. Através da análise de significância das regressões, classificou-se como: (i) altamente significativas ($p < 0,001$) as regressões para as castas Syrah, TN e OC; (ii) muito significativas ($p < 0,01$) para a casta AB; (iii) significativa ($p < 0,05$) para a casta CS. Esta correlação mais baixa para a casta CS está de acordo com os obtidos para AntE da mesma casta, pois os IPT influenciam o cálculo do IMF e, consequentemente, a determinação das AntE.

As análises das retas de todas as castas mostram declives elevados ($m_A=2,1983$; $m_B=1,8274$; $m_C=1,747$; $m_D=1,2098$; $m_E=2,0645$), indicando que, em média, a extração pelo MRap foi cerca de 1,8 vezes superior. Tal como nos parâmetros anteriores esta extração superior ocorreu devido à temperatura superior usada na metodologia (Marquez *et al.*, 2014).

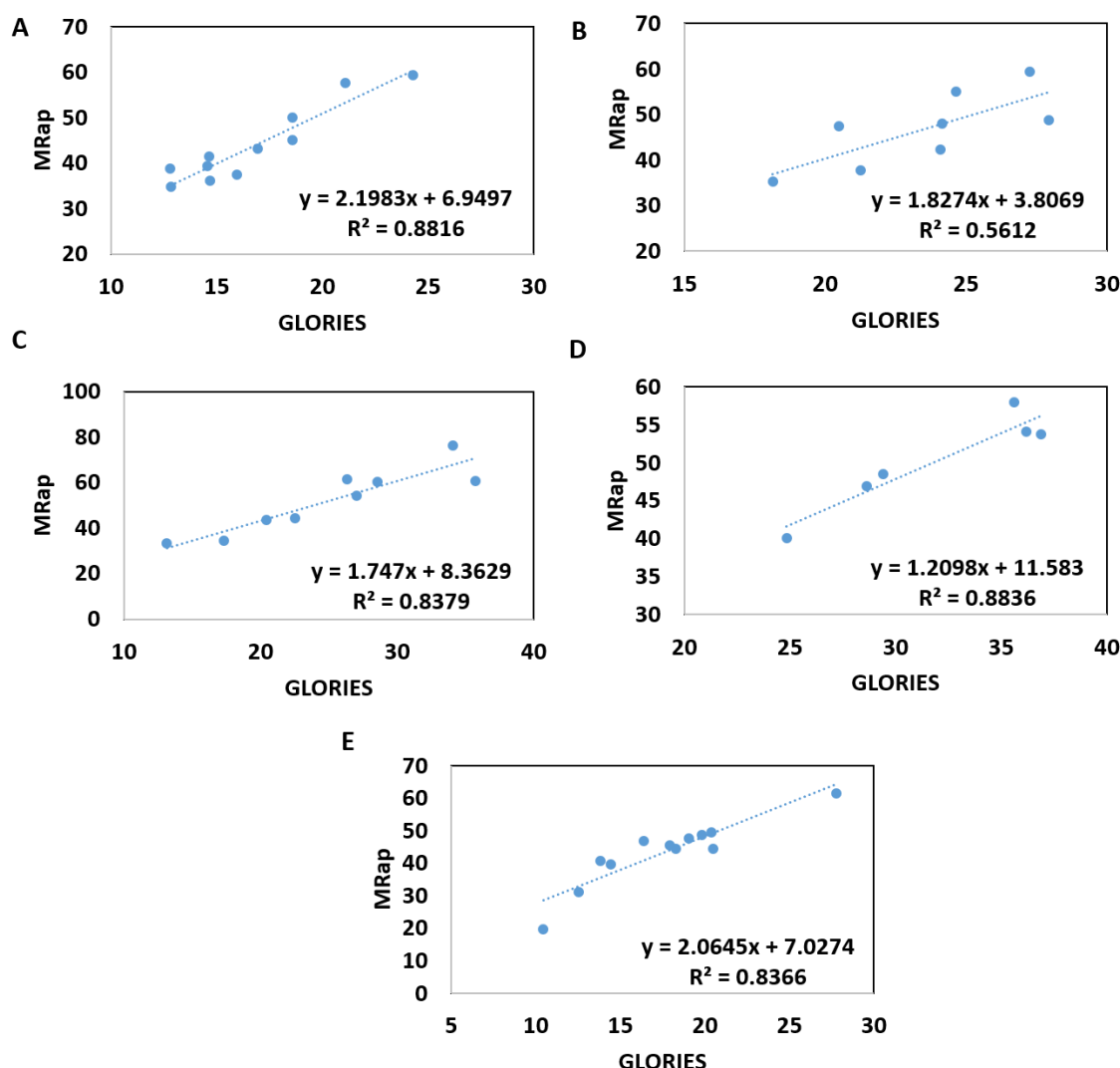


Figura 20 - Comparação entre os IPT de diferentes castas obtidos pelo método de Glories e pelo MRap. A – Syr; B – CS; C – TN; D – AB; E – OC.

3.3.4. Índice de maturação fenólica

A figura 21 apresenta as correlações para os valores dos IMF obtidos pelos dois métodos para as diferentes castas. Para este parâmetro os coeficientes de regressão linear foram superiores a 0,7 para todas as castas, com exceção da casta CS. Através da análise de significância das regressões, classificou-se como: (i) altamente significativas ($p < 0,001$) as regressões para a casta OC; (ii) muito significativas ($p < 0,01$) para a casta Syrah; (iii) significativa ($p < 0,05$) para a casta TN e AB; (iv) não significativa para a casta CS. Desta forma, para a casta CS não é possível estabelecer uma relação entre os métodos, para este parâmetro. Além disso, a baixa correlação está de acordo com o esperado, uma vez que o IMF depende dos IPT e estes também apresentaram uma baixa correlação para esta casta.

As análises das retas de todas as castas mostram declives elevados ($m_A=1,5813$; $m_C=1,1157$; $m_D=1,1865$; $m_E=1,6034$), sendo que em média a extração pelo MRap foi cerca de 1,4 vezes superior do que o método de Glories. Em ambos os métodos foi feita uma divisão entre Abs280nm e Abs520nm. Contudo, no método de Glories, os valores utilizados são medidos a pH=3,2 e a $T \leq 18^\circ\text{C}$, enquanto no MRap utiliza-se pH<1,0 e a $T \approx 78^\circ\text{C}$. Estas diferentes condições fazem com que as extrações dos compostos fenólicos totais e das antocianinas sejam muito diferentes. Além disso, os parâmetros químicos avaliados pelas duas absorvâncias também são diferentes (Abs 280nm – medição anéis aromáticos; Abs 520nm – medição na zona do vermelho), sendo expectável que as relações entre as absorvâncias variem. Ainda assim, pelos gráficos constata-se que existe uma proporcionalidade entre os métodos, sustentada pelo grau de significância das correlações.

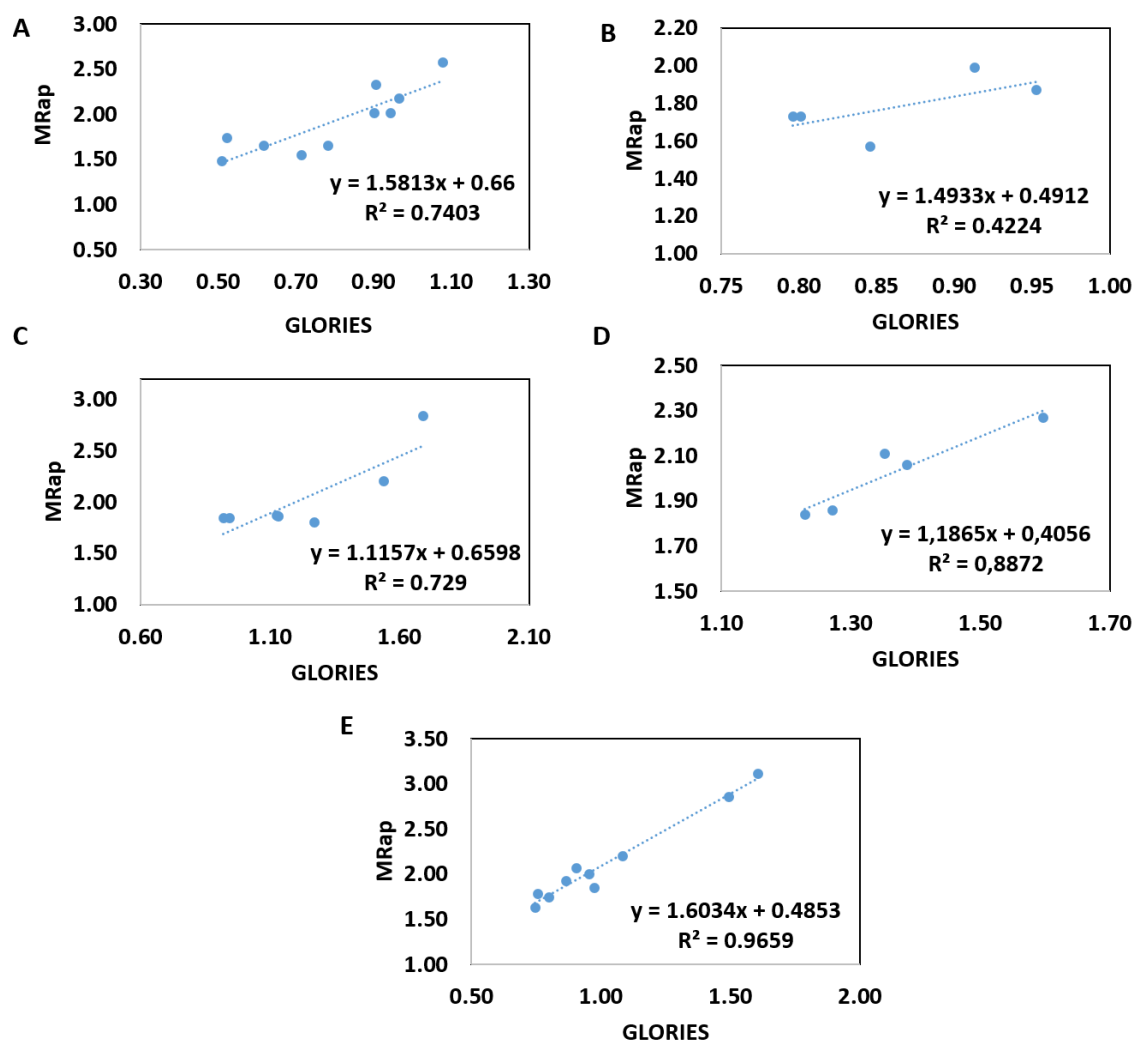


Figura 21 - Comparação entre os IMF de diferentes castas obtidos pelo método de Glories e pelo MRap. A – Syr; B – CS; C – TN; D – AB; E – OC.

3.3.5. Vinhos

Foram analisadas 13 amostras de vinhos provenientes dos mesmos fornecedores que disponibilizaram as amostras de uvas. Contudo, alguns dos vinhos continham mais do que uma casta, cuja proporção era desconhecida. Por isso, só foi possível avaliar a cor provável do vinho pelo método do MRap para 10 das 13 amostras de vinho.

A tabela 4 apresenta a caracterização físico-química dos vinhos utilizados na validação do MRap, relativamente à previsão da cor do vinho, através da análise da uva madura.

Tabela 4 - Parâmetros físico-químicos dos diferentes vinhos.

Região	Casta	pH	%Vol	MV (g/cm ³)	AT (g/L)	AV (g/L)	AM (g/L)	AR (g/L)	AL (g/L)
Lisboa	C	3,47	12,14	0,9950	7,10	0,26	1,32	8,30	0,31
Alentejo	Az	3,81	13,30	0,9927	5,51	0,50	0,00	6,50	1,22
Alentejo	Syr	3,55	14,28	0,9924	6,50	0,40	0,00	6,70	0,83
Tejo	TN	3,83	13,68	0,9923	6,13	0,33	0,00	5,60	1,44
Tejo	Syr A	3,58	14,06	0,9923	6,68	0,10	0,79	6,40	0,62
Tejo	C	3,56	13,50	0,9914	6,15	0,29	0,14	4,80	0,90
Tejo	CS	3,69	14,19	0,9910	6,52	0,33	0,39	5,00	1,01
Tejo	TF	4,04	13,14	0,9933	5,71	0,36	0,08	5,90	1,26
Lisboa	Syr A	3,52	14,27	0,9904	5,39	0,32	0,08	4,70	1,17
Lisboa	Syr B	3,59	15,26	0,9892	5,65	0,27	0,40	4,60	1,09

*Observações: MV – massa volúmica; AT – acidez total; AV – acidez volátil; AM – Ácido málico; AR – açúcares redutores; AL – Ácido láctico.

A análise da tabela 4 permite afirmar que, de modo geral, os vinhos realizaram fermentação malo-lática, uma vez que se observa uma diminuição do ácido málico e um aumento do ácido láctico. Além disso, verificou-se que para a casta Syr da região de Lisboa os vinhos apresentaram valores %Vol superiores e AT inferiores, relativamente às regiões do Alentejo e Tejo. Estas observações não eram esperadas, uma vez que a região de Lisboa, devido à influência atlântica, tem tendência a produzir vinhos de acidez, teor alcoólico e densidade moderados enquanto as regiões do Alentejo e Tejo têm tendência para vinhos com uma acidez baixa, devido a um maior stress hídrico, um teor alcoólico

elevado, devido à maior exposição solar, e uma densidade de solutos média (Climaco *et al.*, 2012; Coombe, 1973). Para a casta castelão, comparando Lisboa com o Tejo, os resultados estão de acordo com o esperado tanto para a %Vol como para a AT. Esta elevada variabilidade entre vinhos das mesmas castas, demonstra como clima e os processos de vinificação influenciam as características finais do vinho (Sacchi *et al.*, 2005).

Na figura 22 está representado a comparação da cor dos vinhos pelo método descrito por Glories (1984) em função da cor estimada obtida pelo MRap, através da análise da amostra de uva mais madura que o respetivo fornecedor providenciou. A partir da análise da significância do coeficiente de regressão linear, cujo valor foi 0,843, verificou-se que a regressão é altamente significativa ($p < 0,001$). Deste modo, conclui-se que o MRap dá uma boa resposta, na medida que os valores se aproximam da realidade obtida no vinho. Além disso, estes resultados estão de acordo com os obtidos pela literatura, onde a correlação foi de 0,8869 (Kontoudakis *et al.*, 2010).

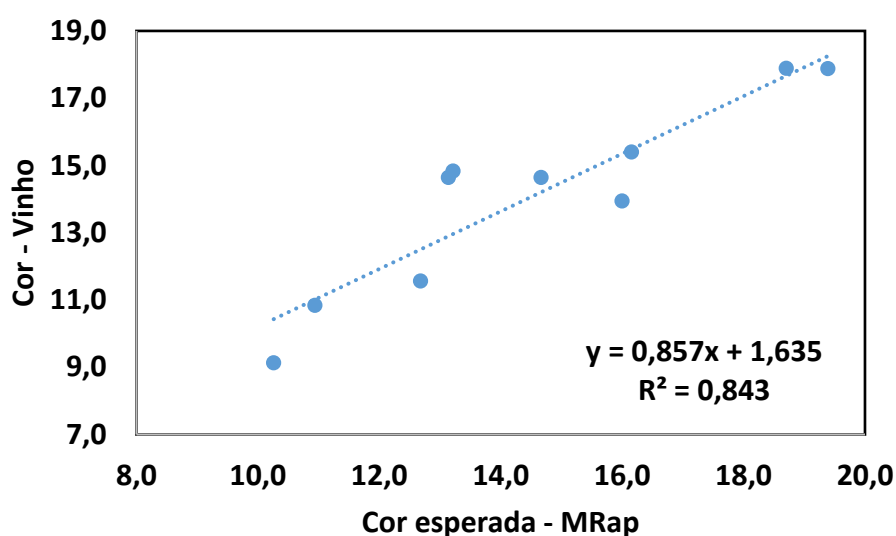


Figura 22 - Comparação da cor do vinho com a cor provável obtida pelo MRap.

3.4. MÉTODO HÍBRIDO

O MRap apresenta vantagens ao nível da rapidez de resultados e redução de recursos humanos, no entanto implica um investimento elevado em reagentes e software. Por isso, considerando as semelhanças entre o MRap e o método de Glories, testou-se a hipótese de combinar a metodologia de Glories com as condições de extração do MRap, desenvolvendo uma metodologia otimizada Método Híbrido (HMS). Os valores obtidos

por esta metodologia alternativa foram comparados com os do MRap, para comprovar a validade dos resultados.

3.4.1. Antocianinas Totais

A figura 23 compara os valores de AntT obtidos pelo HMS e pelo MRap, cujo coeficiente de regressão linear é de 0,915.

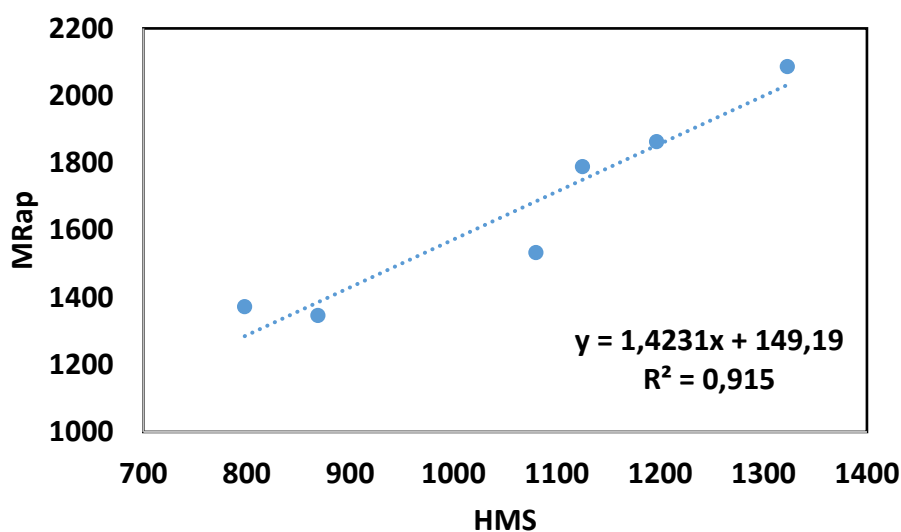


Figura 23 - Comparação entre as AntT, em mg/L, obtidas pelo HMS e pelo MRap.

Comparando os resultados constatou-se que a alteração nas condições de extração para $T=78^{\circ}\text{C}$ (método híbrido) permitiu um aumento das AntT em relação ao método de Glories. Ainda assim, os valores permanecem inferiores aos valores obtidos pelo MRap, o que não era de esperar uma vez que o HMS foi sujeito à mesma temperatura de extração que usada no MRap. Desta forma, estes resultados implicam que os reagentes utilizados no MRap, cuja composição é desconhecida, também favorecem a extração dos compostos fenólicos. Por outro lado, as temperaturas mais elevadas, utilizadas tanto no HMS como no MRap, podem conduzir à ocorrência de reações de acastanhamento não enzimático, nomeadamente, reações de Maillard ou reações de caramelização. A ocorrência de reações de Maillard depende da reação entre o grupo carbonilo de açúcares redutores e grupos amina livres das proteínas. Atendendo que no bago da uva um dos principais aminoácidos é a arginina e que existe uma elevada quantidade de açúcares livres, principalmente glucose e frutose, pode-se sugerir que à temperatura de 78°C poderá

ocorrer alteração da cor devido às reações de Maillard. Em relação às reações de caramelização, uma vez que são promovidas por temperaturas superiores a 120°C, atividade da água baixa e pH superiores a 10, provavelmente não tiveram grande impacto no aumento da cor (Bell & Henschke, 2005; Rovio *et al.*, 2011; Hui *et al.*, 2006).

Analisando o pH dos reagentes, constatou-se que a solução de extração no MRap (pH=0,83) é inferior ao pH da solução de extração do HMS (pH=1,33). Esta diferença de pH, para o mesmo volume de amostra, traduz-se numa quantidade de H⁺ cerca de 3 vezes superior, tratando-se de uma solução mais acídica e, portanto, pode originar uma maior concentração das antocianinas na forma flavílica (Cheynier *et al.*, 2006). Além disso, a possível composição dos reagentes do MRap com solventes hidroxilados, como o etanol e o metanol, podem aumentar o rendimento da extração. A utilização de metanol resulta em melhores extrações do que a utilização de etanol, indicando que os solventes hidroxilados menos hidrofóbicos também melhoram a extração (Ju & Howard, 2003).

3.4.2. Antocianinas Extratáveis

A concentração de AntE no HMS foram determinadas de acordo com a informação disponibilizada pelo fornecedor do equipamento/software MRap. A determinação é feita a partir da aproximação descrita pela equação (1). A partir da dedução desta equação concluiu-se que o índice entre AntE e AntT é aproximadamente semelhante ao índice de AntT e os compostos fenólicos totais (equação 2) (Bioenos, 2013).

$$\begin{aligned}
 (1) \quad [AntE]_{Hibrido} &\approx \frac{[AntT]_{Hibrido}}{IMF_{Hibrido}} \Leftrightarrow \\
 &\Leftrightarrow [AntE]_{Hibrido} \approx \frac{[AntT]_{Hibrido}}{Abs280nm/Abs520nm} \Leftrightarrow \\
 &\Leftrightarrow [AntE]_{Hibrido} \approx [AntT]_{Hibrido} \times \left(\frac{Abs520nm}{Abs280nm} \right) \Leftrightarrow \\
 (2) \quad &\Leftrightarrow \frac{[AntE]_{Hibrido}}{[AntT]_{Hibrido}} \approx \frac{Abs520nm}{Abs280nm}
 \end{aligned}$$

A figura 24 compara os valores de AntE obtidos pelo HMS e pelo MRap, cujo coeficiente de regressão linear é de 0,8373 e análise de significância revela que esta regressão é muito significativa ($p < 0,01$).

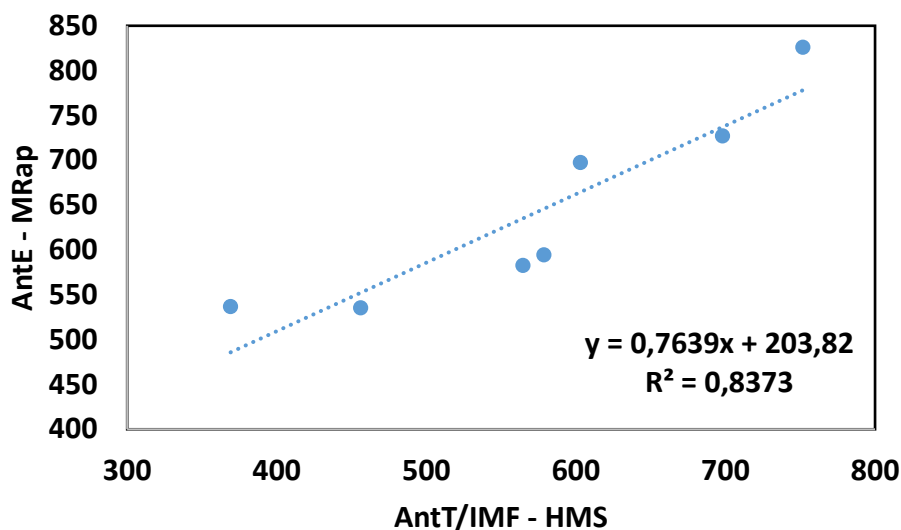


Figura 24 - Comparação entre as AntE, em mg/L, obtidas pelo MRap e a razão entre AntT, em mg/L, e IMF do HMS.

Ao contrário das AntT, os valores obtidos pelo HMS para AntE aproximaram-se muito dos valores obtidos pelo MRap. Esta discrepância entre os dois métodos para os dois parâmetros está relacionada com as formulas de calculo utilizadas. Para as AntT utiliza-se a formula definida por Glories ($\text{AntT} = \text{Abs} \times 875$), sendo que a concentração obtida é diretamente proporcional à Abs 520 nm. Por outro lado, para as AntE, utiliza-se a equação 1 e pela dedução feita (equação 2), verificou-se que as AntE são proporcionais à razão entre a absorvância a 520 nm e 280nm. Desta forma, mesmo que os valores de absorvâncias sejam diferentes, a concentração de AntE serão semelhantes, desde que se mantenha a proporção.

3.4.3. Índice de maturação fenólica

Os IMF obtidos pela metodologia híbrida estão mais próximos dos valores obtidos pelo MRap do que a metodologia de Glories (figura 25). Estes resultados estão de acordo com o esperado, uma vez que na metodologia híbrida a concentração inicial da amostra e a temperatura era a mesma que no MRap. O pH, apesar de permanecer mais ácido no MRap, passou de 3,2 (método de Glories) para um valor próximo de 1 (método híbrido).

Embora, o coeficiente de regressão obtido seja de apenas 0,668, análise de significância ainda classifica a correlação como significativa ($p < 0,05$).

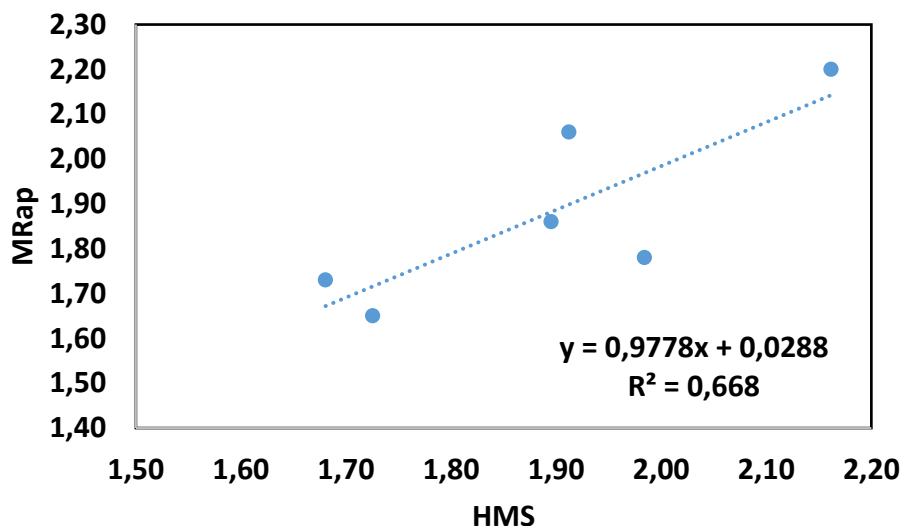


Figura 25 - Comparação entre os IMF obtidos pelo HMS e pelo MRap.

3.5. COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS GLORIES, RÁPIDO E HÍBRIDO

A tabela 5 permite comparar os resultados principais obtidos para cada método, avaliado neste trabalho. A determinação de antocianinas ao longo do amadurecimento de uvas da casta vinhão, pelo método de Glories, obteve bons coeficientes de determinação, contudo, para as AntE a significância da correlação foi apenas significativa ($p < 0,05$).

A validação do método MRap, através da comparação com o método de Glories, revelou grandes variações consoante as castas avaliadas. Enquanto para a casta Syrah e para o conjunto das outras castas, as correlações foram boas e apresentaram elevados coeficientes de significância, para a casta CS os resultados indicaram uma menor adequabilidade do método. Sendo CS uma casta globalmente utilizada, e para a qual o software possui curvas de calibração específicas, seriam de esperar melhores resultados, tal como aconteceu para a casta Syrah. Por este motivo, justifica-se a necessidade de recolher mais amostras da casta CS e verificar se estas correlações se mantêm. Ainda em relação ao método do MRap, verificou-se que a comparação entre a cor real dos vinhos e a cor provável obtido pelo software, apresentou uma boa correlação com elevado coeficiente de significância.

A metodologia híbrida, que combina aspetos tanto do MRap como do método de Glories apresentou resultados promissores, enquanto alternativa ao MRap, apresentando bons coeficientes de determinação e graus de significância das correlações elevados ($p < 0,01$) tanto para as AntT como para as AntE. Por outro lado, a determinação dos valores de IMF entre o HMS e o MRap não foi ideal, apresentando um coeficiente de determinação de apenas 0,67. Ainda assim, os dados indicam que o grau de significância da correlação foi significativo ($p < 0,05$). De modo geral, pode-se considerar que é necessário testar a metodologia alternativa numa amostragem superior, de modo a confirmar a eficiência do método proposto.

Tabela 5 -Comparação dos principais resultados obtidos por cada método avaliado neste trabalho.

Método	Casta	Parâmetro	m	b	r^2	Coefficiente de significância
Glories	Vinhão	Ant T/tempo	20,598	187,13	0,9428	**
		Ant E/tempo	12,492	72,693	0,8977	*
MRap vs Glories	Syr	AntT	3,15	226,11	0,83	***
		AntE	2,05	253,09	0,79	***
		IPT	2,20	6,95	0,88	***
		IMF	1,58	0,66	0,74	**
	CS	AntT	2,83	286,79	0,95	***
		AntE	2,43	107,98	0,38	ns
		IPT	1,83	3,81	0,56	*
		IMF	1,49	0,49	0,42	ns
	TN	AntT	4,61	88,26	0,88	**
		AntE	1,74	300,84	0,62	*
		IPT	1,75	8,36	0,84	***
		IMF	1,12	0,66	0,73	*
	AB	AntT	4,01	-281,97	0,87	*
		AntE	2,06	192,10	0,86	**
		IPT	1,21	11,58	0,88	**
		IMF	1,19	0,41	0,89	*
	OC	AntT	2,76	591,98	0,81	***
		AntE	1,85	276,01	0,94	***
		IPT	2,06	7,03	0,84	***
		IMF	1,60	0,49	0,97	***
Vinho vs MRap	Variável	Cor	0,86	1,78	0,79	***
HMS vs MRap	Variável	AntT	1,42	149,19	0,92	**
		AntE	0,76	203,82	0,84	**
		IMF	0,98	0,03	0,67	*

CAPÍTULO 4 - CONCLUSÕES

A maturação da uva é um processo complexo, cujo acompanhamento do perfil fenólico é fundamental não só para determinar o melhor momento para a realização da vindima como também para personalizar a vinificação das uvas tintas e produzir a vinhos com boa qualidade. Neste contexto, torna-se cada vez mais importante para as empresas que operam no ramo das análises enológicas, encontrar métodos rápidos, fiáveis e economicamente vantajosos, que permitam determinar os parâmetros necessários.

Numa primeira fase, este trabalho pretendia validar um método alternativo, o MRap, para avaliar a maturação fenólica através da comparação com um método convencional, o método de Glories. Os valores obtidos pelo MRap, nomeadamente de AntT, AntE, IPT e IMF, foram sempre muito superiores aos obtidos pelo método convencional. No entanto, observaram-se correlações superiores a 0,8 entre os dois métodos para os valores obtidos nos diferentes parâmetros na maioria das castas analisadas. Para análise da cor do vinho os coeficientes de determinação foram elevados com os índices de cor estimados pelo MRap nas uvas e a significância da correlação foi altamente significativa ($p < 0,001$). Estes resultados demonstram que, de modo geral, o MRap permite obter resultados fiáveis prevendo a cor final do vinho.

Numa tentativa de reduzir os custos com reagentes/software do MRap, testou-se uma metodologia híbrida, combinando aspetos do método de Glories, nomeadamente os reagentes, e o equipamento do MRap. Esta metodologia apresentou resultados promissores, em particular para as determinações de AntT e AntE, onde se obtiveram coeficientes de determinação de 0,92 e 0,84, respetivamente. Contudo, em relação ao IMF, o coeficiente de determinação foi apenas 0,67 mas ainda assim o grau de significância da correlação classifica-a como significativa ($p < 0,05$). Estes resultados indicam que era pertinente realizar mais ensaios, de modo a aumentar o número de amostras analisadas e, consequentemente, aumentar a fiabilidade das correlações.

De modo geral, o MRap revelou ser uma metodologia promissora para ser usada como alternativa às convencionais, sendo mais rápida e mais económica que as metodologias convencionais.

CAPÍTULO 5 - PERSPETIVAS FUTURAS

Perante o estudo realizado na presente dissertação, seria interessante em estudos futuros:

- Testar correlações entre a cor provável obtidos através do HMS e a cor real dos vinhos. Preferencialmente, os vinhos analisados, deveriam ser preparados em laboratório, usando protocolos de vinificação *standard*. Desta forma evitam-se interferências causadas por tratamentos e certos aditivos utilizados pelos produtores, durante a vinificação, que afetem o parâmetro da cor, assim como a utilização de outras castas.
- Fazer uma análise mais aprofundada aos reagentes do MRap para avaliar, por exemplo, a presença de solventes com grupos hidroxilo, assim como de outros compostos que nas condições experimentais de pH e temperatura possam afetar a medição de absorvância a 520nm.
- Avaliar se o rendimento da extração do HMS aumenta com o recurso a solventes hidroxilados, como o metanol, combinados com ácidos hidrofílicos, como o ácido fórmico, durante o processo de extração ou de outras metodologias que promovam a extração de antocianinas, nomeadamente, a utilização de ultrassons (Li *et al.*, 2010).
- Aumentar o número de análises para o HMS e MRap, para as mesmas amostras, de modo a aumentar o número de pontos das retas de calibração, permitindo melhorar os coeficientes de determinação e validar a metodologia proposta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ali, K., Maltese, F., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2010). Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products. *Phytochemistry Reviews*, 9(3), 357–378.

Bell, S.-J., & Henschke, P. A. (2005). Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(3), 242–295.

Bertoldi, D., Larcher, R., Bertamini, M., Otto, S., Concheri, G., & Nicolini, G. (2011). Accumulation and distribution pattern of macro- and microelements and trace elements in *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(13), 7224–7236.

Bioenos. (2013). Cromoenos. (Acedido de <http://www.bioenos.com/cromoenos/index.php>)

Blouin, J. (1992). *Techniques d'analyses des moûts et des vins*. (Dujardin - Salleron) (2ªEdição).

Botelho, G. M. dos A. (2008). Characterisation of the aroma components of clonal grapes and wines from Aragonez and Trincadeira *Vitis vinifera* L. cultivars. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

Cabrita, M. J., Ricardo-da-Silva, J., & Laureano, O. (1999). Os Compostos Polifenólicos das Uvas e dos Vinhos. I Seminário Internacional de Vitivinicultura, 61–102.

Cai, Z., Knorr, D., & Smetanska, I. (2012). Enhanced anthocyanins and resveratrol production in *Vitis vinifera* cell suspension culture by indanoyl-isoleucine, N-linolenoyl-L-glutamine and insect saliva. *Enzyme and Microbial Technology*, 50, 29–34.

Castellarin, S. D., Gambetta, G. A., Wada, H., Shackel, K. A., & Matthews, M. A. (2011). Fruit ripening in *Vitis vinifera*: spatiotemporal relationships among turgor, sugar accumulation, and anthocyanin biosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 62(12), 4345–4354.

Castillo-Sánchez, J. X., García- Falcón, M. S., Garrido, J., Martínez-Carballo, E., Martins-Dias, L. R., & Mejuto, X. C. (2008). Phenolic compounds and colour stability of Vinhão wines : Influence of wine-making protocol and fining agents. *Food Chemistry*, 106, 18–26.

Chervin, C., Aked, J., & Crisosto, C. H. (2012). Grapes. In D. Rees, G. Farrell, & J. Orchard, *Crop Post-Harvest: Science and Technology*. (Wiley-Blackwel). (1ª Edição). 187–211. Oxford, GBR.

Cheyrier, V., Dueñas-Paton, M., Salas, E., Maury, C., Souquet, J. M., Sarni-Manchado, P., & Fulcrand, H. (2006). Structure and properties of wine pigments and tannins. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 298–305.

Climaco, P., Silva, J. R. da, Laureano, O., Castro, R. de, & Tonietto, J. (2012). O Clima Vitícola das Principais Regiões Produtoras de Uvas para Vinho de Portugal.

Coombe, B. G. (1973). The regulation of set and development of the grape berry. *Acta Horticulturae*, 34(34), 261–274.

Coombe, B. G., & McCarthy, M. G. (2000). Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6(2), 131–135.

Correia, P. T. R. (2013). A maturação fenólica em uvas tintas. Comparação de metodologias. Tese de mestrado em Viticultura e Enologia. Universidade de Évora. Évora. 120p.

Costa, E., Cosme, F., Rivero-Pérez, M. D., Jordão, A. M., & González-SanJosé, M. L. (2015). Influence of wine region provenance on phenolic composition, antioxidant capacity and radical scavenger activity of traditional Portuguese red grape varieties. *European Food Research and Technology*, 241(1), 61–73.

DeBolt, S., Cook, D. R., & Ford, C. M. (2006). L-tartaric acid synthesis from vitamin C in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(14), 5608–13.

Delrot, S., Medrano, H., Or, E., Bavaresco, L., & Grando, S. (2010). *Methodologies and Results in Grapevine Research*. (Springer Science & Business Media, Ed.) (1ª Edição). Dordrecht, NED

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2016). FAOSTAT.

Freitas, V. de, & Mateus, N. (2001). Structural Features of Procyanidin Interactions with Salivary Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 940–945.

Garrido, J., & Borges, F. (2013). Wine and grape polyphenols — A chemical perspective. *Food Research International*, 54(2), 1844–1858.

Glories Y. (1984). *La couleur des vins rouges. 2. Mesure, origine et interpretation* (18ª Edição). *Connais Vigne Vin*. Volume 18. Nº4.

González-San José, M. L. G., Barrón L. J. R., Junquera B., Robredo L. M., (1991). Aplicação de Análise de Componentes Principais para amadurecimento Índices de Uvas para vinho. *Journal of Food Composition and Analysis*. 4. 245-255.

González-SanJosé, M. L., & Diez, C. (1992). Relationship between anthocyanins and sugars during the ripening of grape berries. *Food Chemistry*, 43(3), 193–197.

Gutiérrez, I. H., Lorenzo, E. S.-P., & Espinosa, A. V. (2005). Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars, Cabernet Sauvignon, Cencibel, and Syrah. *Food Chemistry*, 92(2), 269–283.

Hui, Y. H., Nip, W.-K., Nollet, L. M. L., Paliyath, G., & Simpson, B. K. (2006). *Food Biochemistry and Food Processing*. (Blackwell Publishing) (1ª Edição). Iowa, USA.

INE -Instituto Nacional de Estatística. (2016). *Estatísticas do Comércio Internacional*. Lisboa: Instituto Nacional de Estatística, I.P.

IVV - Instituto da Vinha e do Vinho. (2016). *Exportação/Expedição de vinhos - Série 2010 a 2014*. (Acedido 13 Janeiro, 2017, from <http://www.ivv.min-agricultura.pt/np4/37/>)

Jackson, R. S. (2008). *Wine Science: Principles and Applications*. (Academic Press) (3ª Edição). San Diego. USA.

Ju, Z. Y., & Howard, (2003). Effects of Solvent and Temperature on Pressurized Liquid Extraction of Anthocyanins and Total Phenolics from Dried Red Grape Skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5207–5213.

Kalua, C. M., & Boss, P. K. (2009). Evolution of volatile compounds during the development of cabernet sauvignon grapes (*vitis vinifera* l.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(9), 3818–3830.

Kennedy, J. A., Hayasaka, Y., Vidal, S., Waters, E. J., & Jones, G. P. (2001). Composition of Grape Skin Proanthocyanidins at Different Stages of Berry Development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5348–5355.

Kennedy, J. A., Matthews, M. A., & Waterhouse, A. L. (2000). Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry*, 55(1), 77–85.

Kennedy, J. A., Saucier, C., & Glories, Y. (2006). Grape and Wine Phenolics: History and Perspective. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 239–248.

Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Fort, F., Canals, J. M., & Zamora, F. (2010). Analytica Chimica Acta Comparison of methods for estimating phenolic maturity in grapes : Correlation between predicted and obtained parameters. *Analytica Chimica Acta*, 660, 127–133.

Lamikanra, O., Inyang, I., & Leong, S. (1995). Distribution and Effect of Grape Maturity on Organic Acid Content of Red Muscadine Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (43), 3026–3028.

Lang, A., & Thorpe, M. R. (1989). Xylem, phloem and transpiration flows in a grape: Application of a technique for measuring the volume of attached fruits to high resolution using archimedes' principle. *Journal of Experimental Botany*, 40(10), 1069–1078.

Leeuwen, C. Van, Friant, P., Choné, X., Tregoat, O., Koundouras, S., & Dubourdieu, D. (2004). Influence of Climate , Soil , and Cultivar on Terroir. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55(3), 207–217.

Li, Z., Pan, Q., Cui, X., & Duan, C. (2010). Optimization on anthocyanins extraction from wine grape skins using orthogonal test design. *Food Science and Biotechnology*, 19(4), 1047–1053.

Liang, Z., Sang, M., Fan, P., Wu, B., Wang, L., Duan, W., & Li, S. (2011). Changes of Polyphenols, Sugars, and Organic Acid in 5 Vitis Genotypes during Berry Ripening. *Journal of Food Science*, 76(9), 1231–1238.

Lima, S., Priscila, A., Sampaio, Y. C., Vianello, F., Pace, G., & Lima, P. (2015). Influences of the Harvest Season on Analytical Characteristics of Syrah Grapes and Wines Produced in the Northeast Region of Brazil. *International Journal of Agriculture and Forestry*, 5(2), 151–159.

Lorenzini, M., Millionsi, R., Franchin, C., Zapparoli, G., Arrigoni, G., & Simonato, B. (2015). Identification of potential protein markers of noble rot infected grapes. *Food Chemistry*, 179, 170–174.

Marquez, A., Perez-serratos, M., Varo, M. A., & Merida, J. (2014). Effect of Temperature on the Anthocyanin Extraction and Color Evolution during Controlled Dehydration of Tempranillo Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 7897–7902.

Mazza, G., Fukumoto, L., Delaquis, P., Girard, B., & Ewert, B. (1999). Anthocyanins, Phenolics, and Color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir Wines from British Columbia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 4009–4017.

Navarro, S., León, M., Roca-Pérez, L., Boluda, R., García-Ferriz, L., Pérez-Bermúdez, P., & Gavidia, I. (2008). Characterisation of Bobal and Crujidera grape cultivars , in comparison with Tempranillo and Cabernet Sauvignon : Evolution of leaf macronutrients and berry composition during grape ripening. *Food Chemistry*, 108, 182–190.

Niepoort (Vinhos) S.A. (2016). Relatórios de Vindima. (Acedido 15 de Junho, 2017, de <http://www.niepoort-vinhos.com/pt/reports/>)

Nogales-bueno, J., Hernández-hierro, J. M., José, F., & Heredia, F. J. (2013). Determination of technological maturity of grapes and total phenolic compounds of grape skins in red and white cultivars during ripening by near infrared hyperspectral image: A preliminary approach. *Food Chemistry*, 1–25.

OIV. Statistics. The International Organisation of Vine and Wine. 2012.

Ong, B. Y., & Nagel, C. W. (1978). High-Pressure liquid chromatography analysis of hydroxycinnamic acid-tartaric acid esters and their glucose esters in *Vitis vinifera*. *Journal of Chromatography*, 157(5010), 345–355.

Paixão, N., Perestrelo, R., Marques, J., & Câmara, J. (2007). Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chemistry*, 105(1), 204–214.

Panceri, C. P., Gomes, T. M., Gois, J. S. De, Borges, D. L. G., & Bordignon-luiz, M. T. (2013). Effect of dehydration process on mineral content , phenolic compounds and

antioxidant activity of Cabernet Sauvignon and Merlot grapes. *Food Research International*, 54(2), 1343–1350.

Pérez-Magariño, S., & González-San José, M. L. (2004). Evolution of Flavanols, Anthocyanins, and Their Derivatives during the Aging of Red Wines Elaborated from Grapes Harvested at Different Stages of Ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1181–1189.

Peynaud, E. (1993). *Conhecer e trabalhar o vinho*. (Editora Litexa) (2ª Edição). Lisboa. POR.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2006a). The Grape and its Maturation. In John Wiley & Sons, *Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications* (2ª Edição). Vol. 1. 241–298. Chichester. GBR.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006b). *Handbook of Enology. Handbook of Enology, The Chemistry of Wine: Stabilization and Treatments: Volume 2*. (John Wiley & Sons, Ltd) (2ª Edição). Chichester, GBR.

Rovio, S., Sirén, K., & Sirén, H. (2011). Application of capillary electrophoresis to determine metal cations, anions, organic acids, and carbohydrates in some Pinot Noir red wines. *Food Chemistry*, 124(3), 1194–1200.

Ryan, J.-M., & Revilla, E. (2003). Anthocyanin Composition of Cabernet Sauvignon and Tempranillo Grapes at Different Stages of Ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(11), 3372–3378.

Sacchi, K. L., Bisson, L. F., & Adams, D. O. (2005). A Review of the Effect of Winemaking Techniques on Phenolic Extraction in Red Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56(3), 197–206.

Styger, G., Prior, B., & Bauer, F. F. (2011). Wine flavor and aroma. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(9), 1145–1159.

Sweetman, C., Deluc, L. G., Cramer, G. R., Ford, C. M., & Soole, K. L. (2009). Regulation of malate metabolism in grape berry and other developing fruits. *Phytochemistry*, 70(11–12), 1329–1344.

Teixeira, A., Eiras-Dias, J., Castellarin, S., & Gerós, H. (2013). Berry Phenolics of Grapevine under Challenging Environments. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 18711–18739.

Tian, R. R., Pan, Q. H., Zhan, J. C., Li, J. M., Wan, S. B., Zhang, Q. H., & Huang, W. D. (2009). Comparison of phenolic acids and flavan-3-ols during wine fermentation of grapes with different harvest times. *Molecules*, 14(2), 827–838.

Topalovic, A., & Mikulic-Petkovsek, M. (2010). Changes in sugars, organic acids and phenolics of grape berries of cultivar Cardinal during ripening. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 8, 223–227.

Vidal, S., Williams, P., Doco, T., Moutounet, M., & Pellerin, P. (2003). The polysaccharides of red wine: total fractionation and characterization. *Carbohydrate Polymers*, 54(4), 439–447.

Zhu, L., Zhang, Y., & Lu, J. (2012). Phenolic Contents and Compositions in Skins of Red Wine Grape Cultivars among Various Genetic Backgrounds and Originations. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(12), 3492–3510.